

Charakterisierung
von Peritonealmakrophagen
des Meerschweinchens
mittels der Durchflußzytometrie

Alexander Raffael

Das
München
1984

Charakterisierung von Peritonealmakrophagen des
Meerschweinchens mittels der
Durchflußzytometrie

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von
Alexander Raffael
aus München

durchgeführt
am
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE
Arbeitsgruppe Krebszellforschung
unter der Leitung von
Prof. Dr. Günter Valet

Mai 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hartwig Cleve
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Fritz Kaudewitz
- Sondervotum: Prof. Dr. Günter Valet

Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Günter Valet für die stetige Unterstützung und Förderung der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Reinhard Burger und Frl. Dr. Ursula Mauer vom Inst. f. Med. Mikrobiologie, Universität Mainz, für die Überlassung der monoklonalen Antikörper,

Herrn Dr. Thomas Lander, Inst. f. Diabetesforschung München, für die Unterstützung bei den Insulinversuchen,

Herrn Prof. Dr. Dr. Gerhard Ruhenstroth-Bauer für seine Anregungen und sein Interesse an dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Hartwig Cleve für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Hella Horst und Herrn Dr. Lorenz Rüssmann aus unserer Arbeitsgruppe für wesentliche Diskussionen und Hilfen bei Problemen der Datenverarbeitung.

INHALTSVERZEICHNIS

	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	1
1.0	<u>EINLEITUNG</u>	3
1.1	Natürliche Heterogenität von Zellarten	3
1.1.1	Heterogenität von Makrophagen	3
1.1.2	Methoden zur Trennung und Charakterisierung von Zellen	6
1.1.3	Durchflußzytometrie	6
1.2	Zielsetzung der Arbeit	7
2.0	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	8
2.1	Zellkulturmedien	8
2.2	Pufferlösungen	8
2.3	Chemikalien	9
2.4	Eichpartikel	10
2.5	Partikel für Phagozytoseversuche	10
2.6	Antikörper	10
2.7	Versuchstiere	10
2.8	Gewinnung peritonealer Makrophagen	11
2.9	Makrophagenadhärenz	12
2.10	Makrophagenphagozytose	14
2.11	Makrophagenaktivierung	14
2.12	Monoklonale Antikörper	15
2.13	periphere Humanleukozyten	17
2.13.1	Monozyten und Lymphozyten	17
2.13.2	Granulozyten	17
2.14	Knochenmark	18
2.15	Tumor R3230AC	18
2.15.1	Tumortransplantation	18
2.15.2	Tumorzellkultur	19
2.16	Hepatozytenisolierung aus Rattenleber	20
2.17	Zellvitalitätsbestimmung und Zytozentrifuge	20
2.18	Rattenleberextrakt	21
2.19	Spektroskopische Untersuchungen	21

2.19	Spektroskopische Untersuchungen	21
2.20	Durchflußzytometrie	22
2.20.1	Fluvo-Metricell Durchflußzytometer	22
2.20.2	Intrazelluläre pH-Messung	26
2.21	Insulinabhängige Änderungen des intrazellulären pH-Wertes mononukleärer Leukozyten	28
2.22	Indirekte Immunfluoreszenzmessung	29
3.0	<u>ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG</u>	31
3.1	Messung intrazellulärer pH-Werte	31
3.2	Durchflußzytometrische Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes von Einzelzellen mit DCH als Fluoreszenzindikator	34
3.2.1	Spektrale Eigenschaften von DCH und ADB	36
3.2.2	pH-Messung im Fluvo-Metricell	44
3.2.2.1	Auswertung der pH-Messung	44
3.2.2.2	Abhängigkeit des intrazellulären pH-Wertes von Farbstoffkonzentration und Inkubationsdauer	48
3.2.2.3	Messung der zellulären Esteraseaktivität	50
3.3	Bestimmung des absoluten intrazellulären pH-Wertes mit DCH	51
3.3.1	pH-Eichung im Gleichlicht	52
3.3.2	pH-Eichung mit porösen Polymerpartikeln	55
3.3.3	pH-Eichung mit toten Zellen	60
3.3.4	pH-Eichung mit lebenden Zellen	62
3.3.4.1	pH-Angleich lebender Zellen an das Medium-pH	62
3.3.4.2	pH-Angleich mit Gramicidin D	64
3.3.4.3	pH-Angleich mit Gramicidin D und Na-Azid	66
3.3.4.4	Intrazelluläre pH-Werte verschiedener Zelltypen	68
3.3.4.5	Regulationsfähigkeit von Zellen bei Änderungen des extrazellulären pH-Wertes	69
3.3.5	Schlußfolgerungen aus den Eichversuchen des intrazellulären pH-Wertes	72
3.4	Charakterisierung peritonealer Meerschweinchenmakrophagen	74
3.4.1	Charakterisierung residenter peritonealer Zellen	75

3.4.2	Charakterisierung paraffinölinduzierter Exsudatzellen	82
3.5	Einfluß von Insulin auf den intrazellulären pH-Wert von Monozyten und Lymphozyten	93
3.6	Charakterisierung von Makrophagen mit monoklonalen Antikörpern	99
3.6.1	Antigenexpression residenter und paraffinölinduzierter Makrophagen	103
3.6.2	Antigenexpression paraffinölinduzierter Peritonealmakrophagen nach in vitro Aktivierung	109
3.6.3	Vergleich residenter und induzierter Makrophagen	111
4.0	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	116
5.0	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	118

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADB	1,4-Diacetoxy-2,3-dicyanobenzol
ADCC	Antikörperabhängige Zytotoxizität
BSA	Rinderserumalbumin
DCH	2,3-Dicyanhydrochinon
DEAE	Diäthylaminoäthan
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium
DMF	Dimethylformamid
DMO	5,5-Dimethyl-2,4-oxazolidindion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiaminetetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
F1	Fluoreszenzwellenlängenbereich 1
F2	Fluoreszenzwellenlängenbereich 2
G/V	Gewicht zu Volumen
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure
i.p.	intraperitoneal
KHEP	Kalium-HEPES-Puffer
KP	Kalium-Phosphat-Puffer
L-15	Medium Leibovitz
KPG	Kalium-Phosphat-Glycin-Puffer
LPS	Lipopolysaccharid
MG	Molekulargewicht
MNL	Mononukleäre Leukozyten
MPS	mononukleäres phagozytotisches System
NMR	Kernresonanz
pH _i	intrazelluläres pH (darunter wird der gesamte von der Plasmamembran umschlossene Zellbereich einschließlich Zytoplasma und Organellen verstanden)
PBS	phosphatgepufferte Saline
poly I:C	poly-Inosin:Cytidinsäure
RNS	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur (21-23 °C)
s.c.	subcutan
TBA	TRIS gepufferte physiologische Kochsalzlösung mit BSA und Na-Azid
TPS	TRIS-Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
VK	Variationskoeffizient (Standardabweichung/Mittelwert)
V/V	Volumen zu Volumen

1.0 EINLEITUNG

1.1 Natürliche Heterogenität von Zellarten

Um die Leistungen der Zellen des Immunsystems besser zu verstehen und zu beeinflussen ist es notwendig, die Funktionen und das Zusammenspiel der einzelnen Zellarten, aus denen das System besteht, zu kennen. Diese Zellarten kommen mit wechselnden Anteilen in ihrer natürlichen Umgebung, wie Lymphknoten, Knochenmark oder Thymus in enger räumlicher Nachbarschaft vor. Die einzelnen Zellarten wie z.B. die Makrophagen oder auch die Lymphozyten sind ihrerseits keine homogene Klasse von Zellen, sondern können je nach Aufgabe und Zustand des Organismus erhebliche funktionelle und morphologische Unterschiede aufweisen. Solche Untergruppen einer Zellart werden im folgenden als "Zellpopulationen" bezeichnet.

1.1.1 Heterogenität von Makrophagen

Den Makrophagen, die mit ihren Vorläuferzellen, den Monozyten, das mononukleäre phagozytotische System (MPS (van Furth et al., 1972)) bilden, wird heute eine zentrale Stellung im Immunsystem eingeräumt. Die Zellen des MPS entstehen im Knochenmark aus Vorläuferzellen (van Furth et al., 1980). Sie werden durch Enzymaktivitäten (wie unspezifische Esterase, Lysozym, Peroxidase), den Besitz von Fc- und C3-Rezeptoren, (Immun-)phagozytose und Adhärenzfähigkeit charakterisiert. Die Zellen des MPS teilen sich außerhalb des Knochenmarks normalerweise nicht.

Makrophagen kommen als freie oder gewebsgebundene Zellen z.B. in Lymphknoten, Milz, Lunge, Knochenmark, Pleura, Peritoneum vor und erhielten, als ihre Funktion noch ungeklärt war, je nach Lokalisation und morphologischen Merkmalen ver-

schiedene Bezeichnungen, wie z.B. die Kupffer'sche Sternzellen in der Leber, Histiozyten im Bindegewebe, Mikrogliazellen im Zentralnervensystem und Osteoklasten im Knochen (van Furth, 1980).

Historisch gesehen wurde der Phagozytosefähigkeit der Makrophagen eine grundlegende Bedeutung für die Resistenz des Organismus gegen bakterielle und parasitäre Infektionen zuerkannt (Metchnikoff, 1905). Später wurde eine Reihe weiterer Funktionen entdeckt, wie die Sekretion humoraler Faktoren (z.B. Monokine und Komplementkomponenten (Rocklin, 1980)), zytotoxische und mikrobizide Fähigkeiten und die Bedeutung für die Induktion und Regulation der zellulären und humoralen Immunität (Rosenthal, 1980).

Die morphologische und funktionelle Heterogenität der Makrophagen ist sowohl von Organ zu Organ, wie auch innerhalb eines Organes (Hopper et al., 1979, Walker, 1982) beobachtbar. Ein Beispiel für die Heterogenität von Makrophagen in verschiedenen Organen ist der oxidative Stoffwechsel von Lungenmakrophagen und der glykolytische von Peritoneal- und Milzmakrophagen (Hopper et al., 1979), die mit einer Anpassung der Zellen an den jeweiligen Standort erklärt wird. Heterogenitäten von Makrophagen innerhalb von Organen (wie Peritoneum und Milz) wurden gefunden in

- der Zellgröße (Morahan et al., 1982)
- Enzymaktivitäten wie z.B. unspezifische Esterase (Tsuda et al., 1979), saure Phosphatase (Suga et al., 1980), Peroxidase (Daems & van der Rhee, 1980) und Transglutaminase (Schroff et al., 1981)
- der Lektinbindung (de Water et al., 1981)

- der Ia-Antigenexpression (Walker et al., 1983)
- Komplementrezeptoren (Walker & Yen, 1982)
- der Expression von Zelloberflächendeterminanten (LeBlanc et al., 1982)
- der Tumorzytotoxizität (Morahan et al., 1981)
- der Phagozytose und Adhärenz (Lohmann-Matthes, 1980).

Die Expression dieser Eigenschaften kann durch bestimmte Stimuli spezifisch verändert werden. So wird nach zahlreichen funktionellen, biochemischen und morphologischen Kriterien der natürlich vorkommende "residente Makrophage" einerseits vom "stimulierten Makrophagen" (stimuliert durch lokale Entzündungen, z.B. mit Proteosepepton oder Paraffinöl) und andererseits vom "aktivierten Makrophagen" (aktiviert z.B. durch lösliche Faktoren, "Lymphokine", die von spezifisch stimulierten Lymphozyten freigesetzt wurden) unterschieden (Morahan, 1980). Funktionell gesehen zeigen aktivierte, nicht jedoch stimulierte Makrophagen die Fähigkeit, intrazelluläre Krankheitserreger abzutöten und Tumorzellen zu zerstören (Key et al., 1982).

Makrophagen können auch entsprechend dem Organ, in das sie eingewandert sind, ihre morphologischen und funktionellen Eigenschaften verändern, was bis zu einem Verlust typischer "Makrophageneigenschaften" führen kann. Die Einordnung solcher Populationen in das MPS ist daher oft erschwert. So wird die adhärente, nicht-phagozytierende dentritische Follikelzelle von Lymphknoten und Milz nicht zu den Makrophagen gerechnet (Steinman & Cohn, 1974). Aus der Heterogenität der Makrophagen ergibt sich die Notwendigkeit, sie anhand mehrerer zellulärer Parameter¹⁾ auf Einzelzellniveau möglichst genau zu charakterisieren.

1.1.2 Methoden zur Trennung und Charakterisierung von Zellen

Funktionelle Eigenschaften von Zellen werden häufig mit Verfahren bestimmt, die Durchschnittswerte aller Zellen eines Meßansatzes liefern. Bei biochemisch oder zellulären Ansätzen ist dann nur schwer entscheidbar, ob das Ergebnis durch die Tätigkeit aller Zellen oder nur durch die einer Zellminderheit zustande kommt. Da Zellpräparationen aus Körperorganen praktisch immer aus verschiedenen Zellarten bestehen, ist es notwendig, vor der Analyse die gewünschte Zellart nach physikalischen, chemischen oder funktionellen Eigenschaften anzureichern (Catsimpoolas, 1977). Anreicherungen von Makrophagen aufgrund physikalischer Eigenschaften wie Größe, Dichte und Ladung oder spezifischer funktioneller Eigenschaften wie Adhärenz oder Phagozytose sind beschrieben worden (Adams et al., 1981). Solche Anreicherungen sind teilweise langwierig, wodurch sich die Eigenschaften der Zellen verändern können. Außerdem bestehen auch bei präparativ angereicherten Zellarten meistens noch Heterogenitäten in der Zellzusammensetzung. Es ist deshalb wünschenswert, Untersuchungen möglichst auf der Einzelzellebene durchzuführen. Zu diesem Zweck gewinnt in den letzten Jahren ein neuartiges Messverfahren, die Durchflußzytometrie, zunehmende Bedeutung.

1.1.3 Durchflußzytometrie

Das Kennzeichen der Durchflußzytometrie ist die schnelle, quantitative Charakterisierung großer Mengen von Einzel-

-
- 1) Als Parameter werden zelluläre Eigenschaften, wie z.B. die Zellgröße, die Esteraseaktivität, das intrazelluläre pH definiert.

zellen in Suspension (Übersicht: Melamed et al., 1979, Kruth, 1982).

Zellen können durch zwei Parametergruppen charakterisiert werden, die einerseits auf Syntheseleistungen der Zelle und andererseits auf Funktionszuständen, die durch das ionische Milieu der Zelle bestimmt sind, beruhen. Zu den Syntheseparametern gehören u.a. DNS, RNS, Proteine, Lipide, Antigene, Membranrezeptoren und Oberflächenladungsdichte, zu den Funktionsparametern z.B. das Zellvolumen, das elektrische Transmembranpotential, der intrazelluläre pH-Wert und Enzymaktivitäten. Beide Parametergruppen können durchflußzytometrisch bestimmt werden.

Die Durchflußzytometrie ermöglicht nicht nur die schnelle, simultane Analyse mehrerer Parameter jeder einzelnen Zelle, sondern auch die präparative Anreicherung ("Sorten") von lebenden Zellen mit interessanten Eigenschaften. Die isolierten Zellen können kultiviert und weiter biochemisch untersucht werden.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Es war das Ziel dieser Arbeit, Heterogenitäten von Meerschweinchenperitonealmakrophagen mit Hilfe eines Dreiparameter-Durchflußzytometers auf Einzelzellebene näher zu charakterisieren. Neben residenten Zellen sollten paraffinölinduzierte und aktivierte Makrophagen in Bezug auf Funktionseigenschaften, wie Adhärenz, Phagozytosefähigkeit, Zellvolumen, Esteraseaktivität, intrazelluläre pH-Wert und Reaktion auf Hormongaben, sowie auf ihren Antigenbesatz hin untersucht werden.

2.0 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellkulturmedien

DMEM für Spektroskopie, fertiges Flüssigmedium (Boehringer, Mannheim)

L-15, Pulvermedium (Boehringer, Mannheim)

RPMI1640 mit 25 mM HEPES, fertiges Flüssigmedium (Gibco, Karlsruhe)

FCS: "HY-Clone" (Paesel, Frankfurt), mit weniger als 1 ng/ml Endotoxin. 30 Min., bei 56 °C hitzeinaktiviert.

Lymphozytentrennmedium: MSL (Dichte 1.077) (Mediapharm, Aschaffenburg)

Trypsinierlösung: (Serva, Heidelberg; Trypsin 0,03 % (G/V, bzw. 0,5 U/mg) in PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} mit 10 gr/l Glucose)

Dispaselösung: Dispase aus Bacillus polymyxa, Reinheitsgrad II, 0,5 U/mg (Boehringer, Mannheim), 1,25 U/ml in TBS.

2.2 Pufferlösungen

KHEP 10 mM HEPES, pH 5 - 9
 150 mM KCl

KP 10 mM Natriumphosphat, pH 5 - 9
 150 mM KCl

KPG 10 mM Natriumphosphat, pH 5 - 9
 10 mM Glycin
 150 mM KCl

TBA 10 mM TRIS, pH 7,1 (20 °C)
 0,95 % (G/V) NaCl
 1,5 % (G/V) BSA
 0,01 % (G/V) Na-Azid

TBS 10 mM TRIS pH 7,1 (20 °C), 300 mOsm, 16,2 mSiemens
 0,95 % (G/V) NaCl

TPS 10 mM TRIS, pH 5 - 9
 10 mM Natriumphosphat
 0,95 % (G/V) NaCl

Alle Phosphatpuffer wurden durch Mischen äquimolarer
 Lösungen (10 mM) von Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 bereitet.

2.3 Chemikalien

BSA	Sigma (München)
DCH	EGA-Chemie (Steinheim)
DMF	Baker (Deventer, Holland)
Fluoresceindiacetat	Sigma (München)
Gramicidin D, von Bacillus brevis	-"-
Poly-L-Lysin HBr, Typ I-B, mittleres MG 110.000, Polymerisationsgrad 520	-"-
poly L- α -Ornithin HBr, Typ I-C, mittleres MG 100.000, Polymerisationsgrad 500	-"-
Protaminsulfat, vom Lachs	-"-
Poly-Inosin:Cytidinsäure	-"-
Insulin (Schwein)	Nordisk Insulinlaboratorium (Kopenhagen)
LPS E.coli 0111:B4	Difco (Detroit, Michigan, USA)
Mithramycin A	Serva (Heidelberg)
Paraffin dünnflüssig	Merck (Darmstadt) Nr. 7174

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, als
 "pro analysi"-Substanzen bezogen.

Es wurde doppelt quarz-destilliertes Wasser verwendet.

2.4 Eichpartikel

CM-Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose CL-6B, Sepharose CL-4B, Pharmacia (Uppsala, Schweden)

Monodisperse Latexpartikel (NH_2 -substituiert, Durchmesser 4,88 μm , Volumen-VK 0,8 - 2 %): Von Prof. Ugelstad, University of Trondheim (Norwegen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.5 Partikel für Phagozytoseversuche

Carboxylierte und mit Rhodamin D konjugierte monodisperse Latexpartikel, Durchmesser 1,25 μm : Polysciences, Warrington, PA, USA

2.6 Antikörper

Monoklonale Maus-anti-Meerschweinchen-Peritonealmakrophagen-Antikörper wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Burger, Inst. für Med. Mikrobiologie, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt.

FITC-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (F/P Verhältnis 3,71 mg/g) wurde von der Fa. Paesel (Frankfurt) bezogen.

2.7 Versuchstiere

Meerschweinchen: Weibliche Tiere des Stammes Pribright (Gewicht ca. 500 g) wurden von der Fa. Ivanovas, Kißlegg bezogen und im institutseigenen Tierstall bei 22 °C und 50 % rel. Feuchtigkeit gehalten. Wasser und gepreßtes Trocken-

futter (Fa. Stettner, München) standen ad libitum zur Verfügung.

Ratten: Zur in vivo Kultivierung des Tumors R3230AC für die zellulären pH-Eichversuche wurden weibliche syngene Fischer 344 Ratten (Gewicht 150 - 200 g) von der Fa. Charles River Wiga (Sulzfeld), bezogen. Zur Knochenmarkszellgewinnung wurden syngene Wistar Ratten (Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg) verwendet.

2.8 Gewinnung peritonealer Makrophagen

Residente Makrophagen: Die Meerschweinchen wurden durch Äthernarkose getötet und die Zellen sofort nach Atemstillstand unter sterilen Bedingungen entnommen. Dazu wurden nach Eröffnung der Bauchhöhle durch einen medianen Längsschnitt 60 ml TBS mit 5 U/ml Heparin in den Bauchraum instilliert. Der Bauchraum wurde leicht massiert und ein an der Basis mehrfach perforierter Spritzenkonus einer 20 ml Einmalspritze seitlich an der Bauchwand zwischen den Därmen eingeführt. Die sich im Spritzenkonus ansammelnde Flüssigkeit wurde mit einer 20 ml Spritze über einen Silikonschlauch abgesaugt, in 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) überführt und bei 4 °C gehalten. Die Auswaschung wurde dreimal wiederholt. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 200 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 2 ml L-15 Medium aufsuspendiert. Je Tier wurden zwischen 1,5 und $1,9 \times 10^7$ kernhaltige Zellen gewonnen.

Paraffinöl induzierte Zellen: 20 ml autoklaviertes dünnflüssiges Paraffinöl (Merck, Darmstadt, Nr. 7174) wurden unter Äthernarkose intraperitoneal injiziert. Drei bis 21 Tage später wurden die Zellen wie oben beschrieben unter Verwendung von heparinfreiem TBS gewonnen. Die ausgewaschene

Zellsuspension wurde in einen 500 ml Scheidetrichter gegeben und die Paraffinölphase nach 5minütiger Äquilibration von der Zellsuspension getrennt. Die Ausbeute betrug je nach Dauer der Paraffinölapplikation zwischen $1,8$ und $5,8 \times 10^8$ kernhaltige Zellen pro Tier. Die Vitalität aller Präparationen (bestimmt mit Trypanblau) lag bei 94 bis 98 %.

2.9 Makrophagenadhärenz

Inkubation der Zellen:

Paraffinölinduzierte Peritonealzellen wurden mit RPMI1640 Medium (mit 20 mM HEPES) gewaschen. Je 2 ml der Zellsuspension ($1,4 \times 10^6$ /ml) wurden in Plastikpetrischalen für die Bakteriologie (Durchmesser 3,4 cm, Greiner, Nürtingen) in einer Dichte von $3 - 4 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät und im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 85 % rel. Feuchte) 0,5 bis 50 Stunden inkubiert.

Gewinnung der nicht adhärenenten und adhärenenten Zellen:

Die Petrischalen wurden leicht geschwenkt und die überstehende Flüssigkeit mit den nicht adhärenenten Zellen in Plastikreaktionsgefäße (2,2 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) gegeben. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 200 x g abzentrifugiert (Mikro-Rapid, Fa. Hettich, Tuttlingen) und das Zellsediment in 100 µl TBS aufsuspendiert. Die in den Plastikschalen adhärenenten Zellen wurden mit 1 ml einer Dispaselösung (Dispase II, 1,25 U/ml in TBS, Boehringer, Mannheim) im Brutschrank inkubiert. Nach 8 Minuten wurden die Petrischalen auf Eis gegeben und die Zellen nach 10 Minuten mit einem Gummiwischer abgelöst. Die Zellen wurden in Plastikreaktionsgefäßen (1,5 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) gegeben, mit TBS durch Zentrifugation (5 Min., 200 x g) gewaschen und in 100 µl TBS aufgenommen. Ein Aliquot wurde für die Messung des mittleren Zellvolumens, der mittleren Esterasekonzentration und des mittleren intrazellulären pH im Durch-

flußzytometer verwendet (Das Meßprinzip des Durchflußzytometers (Abb. 1) wird in Abschn. 2.20 erläutert.).

Anmerkung zur Ablösung adhärenter Makrophagen:

Adhärente Makrophagen können durch Trypsinbehandlung von der Kulturschale nicht abgelöst werden (Evans, 1973) und werden daher meist mit einem Gummispatel abgeschabt. In Versuchen wurde festgestellt, daß dabei ca. 40 - 50 % der Zellen abgetötet werden. Eine Steigerung der Vitalität der abgelösten Zellen auf 90 % wurde dadurch erzielt, daß zum einen nicht hydrophilisierte Plastikpetrischalen ("für die Zellkultur"), sondern unbehandelte hydrophobe Schalen ("für die Bakteriologie") verwendet wurden, und zum anderen die Zellen vor dem Abschaben mit Dispase inkubiert wurden.

Auswertung:

Zur Darstellung der quantitativen Verteilung der Zellarten beider Fraktionen in Abhängigkeit von der Inkubation wurden deren relative Anteile mit der Ausbeute, der Vitalität und dem Anteil der Zellen in der gemessenen Fraktion multipliziert.

Die Zellkonzentration und -vitalität der adhären und nicht adhären Fraktion jedes Ansatzes wurde in einer Zählkammer nach Zusatz von Trypanblau (s. Abschn. 2.17) bestimmt. Zur Berechnung der Zellzahl wurde das genaue Volumen jeder Fraktion aus der Gewichts-differenz der Reaktionsgefäße vor und nach Zugabe der Zellen (Waage 1265 MP, Fa. Sartorius, Göttingen) unter Annahme eines spezifischen Gewichts von 1.003 g/ml der Zellsuspension berechnet. Das spezifische Gewicht der Zellprobe war durch mehrmaliges Pipettieren und Wiegen von 1 ml Zellsuspension bei 20 °C bestimmt worden.

Die prozentualen Anteile der einzelnen Zellarten und -populationen in der adhären und nicht adhären Zellfraktion wurden aus dem Histogramm der durchflußzytometrischen Messung ermittelt (2.20.1). Für diese Berechnung wurde vorausgesetzt, daß sich die Zellausbeute und -vitali-

tät auf alle Zellen im gleichen Maß bezieht.

2.10 Makrophagenphagozytose

Frisch gewonnene residente Peritonealzellen aus Meerschweinchen ($1 \times 10^6/\text{ml}$) und rhodamingefärbte Latexpartikel ($1,25 \mu\text{m}$ Durchmesser) wurden im Verhältnis 1 : 15 in RPMI1640/25 mM HEPES Medium in Reaktionsgefäßen im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Drei bis 24 Stunden später wurden im Durchflußzytometer (Abb. 1, Kap. 2.20) nach Anfärbung mit ADB ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) die Phagozytosefähigkeit, die Esteraseaktivität und das Volumen der einzelnen Zellen bestimmt. Die zur Messung im Durchflußzytometer verwendeten Lichtfilter sind in Abb. 2b) wiedergegeben. Zur Bestimmung des intrazellulären pH (pH_i) auch der phagozytierenden Zellen wurde bei der üblichen Lichtfilterkombination für die pH_i -Messung (Abb. 2a) der Spiegel vor der zweiten Photoröhre (PM 2) durch einen Farbteilerspigel (Dichroit) (580 nm) ersetzt. Dieser Dichroit lenkte nur das für die pH-Messung relevante Licht in die zweite Photoröhre, nicht aber die längerwellige Rhodaminfluoreszenz. So unterschieden sich die gemessenen pH_i -Werte von Makrophagen, die rhodamingefärbte Latexpartikel phagozytierten nicht von Zellen, die mit ungefärbten Latexpartikeln ähnlicher Größe ($0,77 \mu\text{m}$) inkubiert worden waren.

2.11 Makrophagenaktivierung

Für die in vitro Aktivierung von Makrophagen wurden paraffinölinduzierte Peritonealmakrophagen verwendet. 10 ml Zellsuspension (4×10^5 Zellen/ ml) wurden in Schalen für die Bakteriologie (Einsaatdichte $2 \times 10^5/\text{cm}^2$, Schalendurchmesser $5,1 \text{ cm}$, Greiner, Nürtingen) bei 37°C in einem Brutschrank

ohne Begasung inkubiert. Das Kulturmedium (DMEM für Spektroskopie, Boehringer, Mannheim), enthielt kein Phenolrot, um eine Farbstoffaufnahme der Zellen zu vermeiden. Dem Medium waren 10 % (V/V) FCS zugesetzt. Die Zellen wurden mit poly I:C bzw. LPS bei einer Endkonzentration von 0 und 100 µg/ml (Stammlösung: 5 mg/ml in TBS) inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Kulturschalen auf Eis gegeben, mit einem Gummiwischer adhärente Zellen abgelöst und mit den nicht adhären Zellen abzentrifugiert (10 Min., 200 x g). Das Zellsediment wurde mit 1 ml TBA gewaschen und für die Antikörperbindungsstudien verwendet.

2.12 Monoklonale Antikörper

Die monoklonalen Maus-anti-Meerschweinchenmakrophagen-Antikörper (Tabelle 1) waren in Anlehnung an ein Verfahren von Fazekas und Scheidegger (Fazekas und Scheidegger, 1980) hergestellt worden (Mauer, 1983). Zu ihrer Bereitung waren paraffinölinduzierte Meerschweinchenmakrophagen mit NS1-Myelomzellen fusioniert worden. Die Hybridzellen, die mit paraffinölinduzierten Exsudatzellen, nicht aber mit Thymozyten und B-Zellen (EN-L2C-Leukämie-Linie) reagierten, wurden kloniert als Aszites in Balb/c Mäusen gehalten. Die zellfreie Aszitesflüssigkeit (verdünnt 1/35 mit TBA) wurde in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tabelle 1: Eigenschaften der monoklonalen Maus-anti-Meerschweinchen-Makrophagen-Antikörper

Nr.	Aszi- tes Nr.	Antik.- Klasse	positiv für				
			Makrophagen induz. ¹⁾	aktiv. ²⁾	resid.	Granulo- zyten	Mono- zyten
1	249	IgG1	+++ ³⁾	+++	+++	-	+
2	253	IgG1	++	+	-	-	-
3	322	IgG1	+++	+++	+++	-	+
4	305	IgG2a	++++	++++	++++	-	-
5	310	IgG2a	++	+	-	-	-
6	257	n.b.	++	-	-	-	-
7	321	IgM	++	+	++	-	-
8	342	IgM	++	++	++	-	+
10	344	IgM	++	+	++	-	-
11	252	IgM	++	+	-	+	+
12	311	n.b.	++	++	n.b.	-	-
13	312	n.b.	++	++	n.b.	-	-
14	313	n.b.	++	+	++	-	-
15	314	n.b.	++	+	+	-	-
16	Kontroll-Antikörper						

Anmerkung: ¹⁾ 3 Tage Paraffinöl, ²⁾ mit Corynebacterium parvum, ³⁾ Bindungsstärke ¹²⁵I markierten Antikörpers:
 - = keine Bdg., + < 2 x Kontr., ++ = 2 x Kontr., +++ = 3 x Kontr., ++++ = 4 x Kontr., n.b. = nicht bestimmt.

2.13 periphere Humanleukozyten

2.13.1 Monozyten und Lymphozyten

Heparinisiertes Blut (20 U/ml) wurde nach venösem Stau aus der Armvene von Normalpersonen entnommen und mit 2 Teilen TBS verdünnt. 35 ml davon wurden auf 15 ml MSL-Lymphozytentrennmedium (MSL, Dichte 1,077, Mediapharm, Aschaffenburg) in 50-ml-Polypropylenzentrifugenröhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) überschichtet und 30 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Die in der Interphase zwischen Trennmedium und Serum angereicherten mononukleären Zellen wurden vorsichtig abgenommen und 3mal mit TBS gewaschen (400 x g, 10 Minuten). Für Untersuchungen mit Insulin wurden die Zellen nach der letzten Zentrifugation in L-15 Medium aufgenommen und die Zellkonzentration auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen waren aus Lymphozyten (ca. 80 %), Monozyten (ca. 20 %) und Granulozyten (ca. 1 %) zusammengesetzt. Die Vitalität (bestimmt mit Trypanblau) lag bei 98 %. Alle Prozeduren wurden bei RT ausgeführt.

2.13.2 Granulozyten

Granulozyten wurden von heparinisiertem Vollblut durch 1 x g Sedimentation mit Dextranzusatz (MG 161.000, 5 %) für 45 Minuten bei 37 °C und anschließender Ficoll-Hypaque Stufengradientenzentrifugation (Dichte unten 1,118, oben 1,077 (20 Min., 800 x g) isoliert (Harthus und Hannig, 1982) und mit RPMI1640 Medium in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert.

2.14 Knochenmark

Nach dem Töten des Tieres durch Äthernarkose wurden beide Femurknochen exstirpiert, an den Enden eröffnet und das Markgewebe nach Einstechen einer Spritze an einem Ende, durch Einpressen von 10 ml TBS am anderen Ende ausgeschwemmt. Die Suspension wurde einmal durch eine Kanüle von 0,9 mm Durchmesser gespritzt, durch ein Kunststoffgewebe (Maschenweite 40 μ m, Monodur, Kempten) filtriert, mit TBS auf 40 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 200 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit TBS in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Knochenmarkszellen von Meer-schweinchen und Ratte wurden in gleicher Weise präpariert.

2.15 Tumor R3230AC

Der R3230 Tumor ist ein spontan in Fischer 344 Ratten entstandenes Mamma-Adenocarcinom (Dunning, 1960). Die hier verwendete Zelllinie R3230AC entstand aus der Sublinie R3230AB (Hilf et al., 1965) und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Harthus, Behringwerke Marburg, zur Verfügung gestellt.

2.15.1 Tumortransplantation

Zur in vivo Kultur wurde 1 ml Tumorzellsuspension (1×10^6 bis 1×10^7 Zellen/Tier) s.c. gespritzt oder es wurden frisch präparierte Tumorfragmente (Größe etwa 5x5x5 mm) s.c. verpflanzt. Vor der Tumorentnahme wurden die Ratten durch Äthernarkose getötet. Der Tumor wurde sofort unter sterilen Bedingungen entnommen, von nekrotischem Material befreit und in TBS mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert. Die

Fragmente wurden mit TBS gewaschen und in einem Trypsiniergefäß mit einer Trypsinlösung (Serva, Heidelberg; Trypsin 0,03 % (G/V) in PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} mit 10 g/l Glucose) bei 37°C im Wasserbad auf einem Magnetrührer 20 Minuten unter mäßigem Rühren inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch vier Lagen Mullgaze filtriert und mit 1-2 ml FCS (hitzeinaktiviert) versetzt, um die Trypsinierung zu stoppen. Nach einer ersten Zentrifugation (5 Min., 200 x g) wurde das Sediment noch 3mal mit TBS bei 200 x g gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in TBS resuspendiert.

2.15.2 Tumorzellkultur

R3230AC Zellen wurden in 75 ml-Polystyrolzellkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg), die mit 25 ml Kulturmedium gefüllt waren (RPMI1640 Medium mit 25 mM HEPES und 10 % (V/V) FCS (hitzeinaktiviert)), eingesät und bei 37 °C, 5 % CO_2 und 85 % relativer Feuchtigkeit inkubiert. Der Tumor wuchs als einschichtiger bzw. teilweise mehrschichtiger Zellrasen. 4 Tage später wurde das Kulturmedium erneuert. Am 7. Tag war Konfluenz erreicht und die Zellen wurden nach Dekantieren des Mediums mit 10 ml Trypsinlösung bei 37 °C inkubiert. Nach 15 Minuten wurden die trypsinierten Zellen mit 1 ml FCS versetzt, in Kulturmedium einmal bei 200 x g gewaschen und $2 - 3 \times 10^5$ Zellen in neue Kulturflaschen mit 25 ml Medium eingesät.

2.16 Hepatozytenisolierung aus Rattenleber

Die Präparation von isolierten Rattenleberzellen wurde nach der modifizierten Methode von Seglen (Goldberg, 1980, Seglen, 1979) durchgeführt. Dazu wurde die Leber mittels einer Perfusionsapparatur (peristaltische Pumpe mit Schlauchoxigenator) zunächst 5 Minuten mit einer Ca^{++} -freien Waschlösung (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,4) und anschließend mit einer Ca^{++} -haltigen Perfusionslösung (L-15 Medium, 500 mg/l Collagenase, 20 mM HEPES, pH 7,6) 25 Minuten lang bei 37 °C perfundiert. Die so erhaltene Leberzellsuspension wurde 3 Minuten bei 50 Upm zentrifugiert (Minifuge, Christ, Osterrode), und das Sediment in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in L-15 Medium aufsuspendiert. Die Vitalität betrug 90 - 95 %. Die auf diese Weise isolierten Zellen wurden freundlicherweise von Herrn F. Storch (Arb.Gruppe Experimentelle Medizin, MPI f. Biochemie) zur Verfügung gestellt.

2.17 Zellvitalitätsbestimmung und Zytozentrifuge

Die Zellen wurden 1 + 1 mit einer Trypanblaulösung (9 mg/ml in TBS) verdünnt und 2 Min. bei RT inkubiert. Die Zahl der ungefärbten, lebenden Zellen wurde in einer Neubauer-Türck-Zählkammer bestimmt. Zur Anfertigung morphologischer Präparate wurden 200 µl Zellsuspension ($1 - 1,2 \times 10^6$ Zellen/ml) in einer Shandon-Elliott-Zytozentrifuge (Shandon Scientific Company, London) 5 Minuten bei 1100 Upm (100 x g) auf Objektträger zentrifugiert. Die luftgetrockneten Präparate wurden nach May-Grünwald-Giemsa angefärbt (Gurr, 1979).

2.18 Rattenleberextrakt

Ratten wurden unter Äthernarkose durch die Femoralarterie bis zum Atemstillstand entblutet. Die Leber wurde entnommen und mit 5 Teilen eines Puffers (0,15 M KCl, 10 mM TRIS, pH 7,2) in einem Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde in einer IEC B 60 Ultrazentrifuge (Biotronik, München) 60 Minuten bei 100.000 x g zentrifugiert. Nach Entfernung der Fettschicht wurden die klaren Überstände abgezogen und portioniert in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Proteinkonzentration des Überstandes betrug 13 mg/ml nach der Bestimmungsmethode von Bradford (Bradford, 1976).

2.19 Spektroskopische Untersuchungen

Fluoreszenzexcitations- und Emissionsspektren wurden mit einem mikroprozessorgesteuerten LS-5 Fluoreszenzspektrometer (Perkin-Elmer, Bodenseewerk, Überlingen) gemessen. Die Anregungsspektren wurden zwischen 230 und 600 nm über ein quantenkorrigiertes Referenzsystem (Rhodamin-Quantenzähler) während der Messung korrigiert. Die Spaltbreite für die Exzitation und Emission wurde für alle Messungen so eingestellt, daß die Wellenlängenauflösung 10 nm bzw. 5 nm betrug. Die Farbstofflösung wurde in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Der gesamte Betrieb des Fluorimeters wurde über ein FORTRAN 77 Computerprogramm (Entwicklung Dr. H. Horst, MPI f. Biochemie) von einem VAX 11/782 Computer gesteuert. Die vom Gerät gelieferten digitalisierten Fluoreszenzintensitäten wurden "on line" mit einer Auflösung von 1 nm vom Computer übernommen. Die Spektren wurden als absolute Amplitudenverteilungen oder auf die maximale Fluoreszenzamplitude standardisiert dargestellt.

2.20 Durchflußzytometrie

2.20.1 Fluvo-Metricell Durchflußzytometer

Das Durchflußzytometer "Fluvo-Metricell" wurde im MPI für Biochemie, Abt. Prof. Ruhenstroth, entwickelt (Kachel et al., 1977, Kachel, 1982). Die Meßkammer des Gerätes ermöglicht die simultane Messung des Volumens und zweier Fluoreszenzen von Einzelzellen mit einer typischen Geschwindigkeit von 500 - 1000 Zellen/sec. Im Gegensatz zu den meisten kommerziell erhältlichen Geräten wird das Zellvolumen nicht über die Kleinwinkelvorwärtsstreuung ($0,2 - 0,5^\circ$) des Anregungslichtes, sondern durch ein elektrisches Verfahren bestimmt, das auf dem Coulterprinzip beruht (Coulter, 1953): Über zwei Kammern, die durch eine Meßöffnung (Durchmesser kleiner als 0,2 mm) miteinander verbunden und mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit gefüllt sind, wird ein konstanter Gleichstrom angelegt (Abb. 1).

Tritt eine elektrisch nicht leitende Zelle durch diese Meßöffnung, erhöht sich der Widerstand der Meßöffnung kurzzeitig, was nach dem Ohm'schen Gesetz einen Spannungspuls bewirkt, der über die beiden Meßkammerelektroden abgenommen werden kann und dessen Amplitude proportional zum Zellvolumen ist (Übersicht: Kachel, 1982). Der Vorteil der elektrischen Volumenmessung liegt darin, daß bei bekannter Zellform (die meisten Zellen in Suspension sind rund) absolute Zellvolumina ermittelt werden können. Dies ist bei der Kleinwinkelstreuung nicht möglich, da sie neben Größe und Form sehr wesentlich noch von anderen Zelleigenschaften, wie Oberflächenbeschaffenheit und Innenstruktur abhängt. Kennt man das absolute Zellvolumen, so können bei simultaner Bestimmung der Fluoreszenzintensität z.B. mittlere intrazelluläre Farbstoffkonzentrationen bzw. mittlere Packungsdichten fluoreszierender Farbstoffe auf der Zelloberfläche errechnet werden.

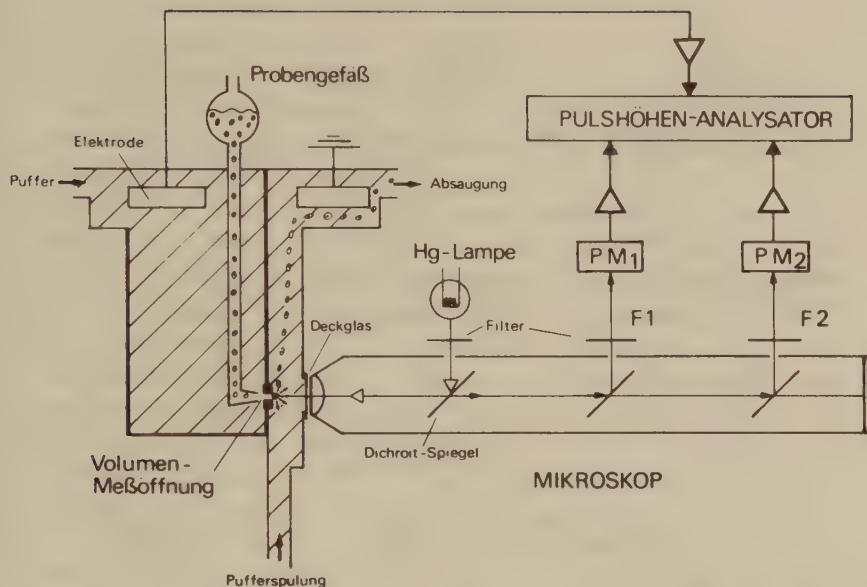


Abb. 1: Schema des Fluvo-Metricell-Durchflußzytometers (PM = Photoröhre, F1 = Fluoreszenzlichtkanal 1, F2 = Fluoreszenzlichtkanal 2).

Volumenmessung:

In dem Fluvo-Metricell-Meßsystem wurden die Zellen in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrahl genau durch die Mitte der zylindrischen Meßöffnung (Durchmesser: 95 μm , Länge: 100 μm , Strom 0,229 mA, hydrostatischer Sog 20,3 kPa) geleitet. Als Puffersystem wurde TBS, dessen Leitfähigkeit auf 16,2 mS (20 $^{\circ}\text{C}$) eingestellt war, verwendet.

Messkammer

Dichroit 420nm

Dichroit 460nm

Spiegel

BG38 315-640nm
Wärmeschutz

UG1 300-400nm
Schott

PM 1 F1 418-440nm

Langpass 418nm

Kurzpass 440nm

PM 2 F2 500-700nm

Langpass 500nm

Messkammer

Dichroit 460nm

Dichroit 530nm

Spiegel

BG38 315-640nm
Wärmeschutz

300-440nm

F1 470-530nm

Langpass 470nm

F2 550-700nm

Langpass 550nm

Diagramm des optischen Aufbaus:

- Light Source: BG38 315-640nm, Wärmeschutz
- Filter: 300-500nm
- Dichroit 500nm
- Dichroit 530nm
- Spiegel
- F1 500-530
- F2 550-700
- Langpass 500nm
- Langpass 550nm
- PM 1
- PM 2

- 24 -

Fluoreszenzmessung:

Das Licht einer 100 Watt Quecksilberhochdrucklampe (HBO-100, Osram) wurde über ein Mikroskopobjektiv (100fache Vergrößerung, numerische Apertur 1,30, Neofluar, Zeiss, Oberkochem), als Epiillumination axial auf die zylindrische Meßöffnung fokussiert. Das von den aus der Meßöffnung austretenden Zellen emittierte Fluoreszenzlicht wurde vom selben Objektiv aufgefangen, durch einen dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht abgetrennt und nach Aufteilung durch einen dichroitischen Spiegel in zwei Lichtwege (Wellenlängenbereich F1 und F2) auf Photoröhren geleitet. Die dichroitischen Spiegel waren von Zeiss (Oberkochem) und die Lichtfilter von Schott (Mainz).

Datenverarbeitung:

Die maximale Höhe der Volumen- und Fluoreszenzsignale jeder einzelnen Zelle wurde von der Meßelektronik digitalisiert. Je nachdem ob es sich um Zwei- oder Dreiparametermessungen handelte, wurden die digitalisierten Signale auf verschiedene Weise weiterverarbeitet.

- Bei einer Zweiparametermessung wurden die Werte in einem 64 x 64 Klassen umfassenden Vielkanalanalysator (AEG Telefunken, Ulm) zwischengespeichert. Nach dem Ende der Messung wurden die Daten mit einem Interdata 74 Computer (Interdata Corp., Oceanport, New Jersey, 64 kbyte Kernspeicher) auf Magnetband geschrieben. Eine Reihe von Fortran IV-Rechenprogrammen (Entwicklung Prof. G. Valet) erlaubte eine zweidimensionale Auszeichnung der Messung als Isoamplitudenmatrix oder nach Projektion der Daten auf eine der beiden Koordinatenachsen als Häufigkeitshistogramm. Von den einzelnen Zellgruppen in den Zweiparameterhistogrammen konnten die Zellzahl, mittleres Volumen, mittlere intrazelluläre Farbstoffkonzentrationen bzw. mittlere Packungs-

lichten fluoreszierender Farbstoffe auf der Zelloberfläche mit statistischen Angaben wie Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet werden. Die Auswertung wurde auf einem Interdata 7/32 Computer (768 Kbyte Kernspeicher) oder auf einem VAX 11/782 Computer (Digital Equipment Co., Maynard, Massachusetts, 8 Mbyte Kernspeicher) durchgeführt.

- Bei Dreiparametermessungen wurden die digitalisierten Meßwerte jeder Einzelzelle mit einer Auflösung von 128 Klassen je Parameter in "list-mode" mit einer maximalen Geschwindigkeit von 2500 Zellen/Sekunde über den Interdata 74 Computer auf Magnetband gespeichert (Benker et al., 1980). Die Daten wurden durch Computerprogramme entweder als ein 22 x 22 x 22 Klassen umfassendes Dreiparameterhistogramm dargestellt (Valet, 1980, Bsp.: Abb. 8a, Kap. 3.2.2.1). oder in verschiedene Zweiparameterprojektionen reduziert und entsprechend einer Zweiparametermessung ausgewertet. Die dreidimensionale Darstellung erlaubte eine anschauliche qualitative Abschätzung von Existenz und Veränderungen vorhandener Zellpopulationen. Für quantitative Auswertungen waren 2-Parameterprojektionen günstiger (s. Beispiel Abb. 8b-e).

2.20.2 Intrazelluläre pH-Messung

5 μ l einer ADB-Stammlösung (1 mg/ml in wasserfreiem DMF, bei -20°C gelagert) wurde mit 250 μ l Zellsuspension (etwa 1×10^6 Zellen/ml) 10 bis 15 Minuten bei 0°C oder RT inkubiert. ADB wird durch intrazelluläre Esterase in fluoreszentes DCH und Acetat gespalten. Inkubationen bei 37°C waren ungünstig, da die Zellen DCH verloren, was zu niedrigen Fluoreszenzsignalen führte. Die Anordnung der optischen Filter für die Fluoreszenzmessung ist in Abb. 2a dargestellt.

DNS-Messung toter Zellen:

DCH reichert sich nur in lebenden Zellen mit einer intakten Membran an und ist damit im Prinzip zur Unterscheidung lebender von toten Zellen geeignet. Allerdings ist es schwierig, schwach positive, lebende Zellen von toten Zellen abzugrenzen. Tote Zellen können jedoch quantitativ erfaßt und von Zellbruchstücken durch den Zusatz von Propidiumiodid zum Meßansatz von den lebenden, DCH-gefärbten Zellen unterschieden werden. Propidiumiodid kann die Zellmembran geschädigter Zellen durchdringen und färbt deren DNS mit intensiv roter Fluoreszenz an. Obwohl Propidiumiodid auch mit doppelsträngiger RNS interkaliert, wurde kein Unterschied in der Färbecharakteristik gefunden, wenn die Zellen vor der Färbung mit oder ohne RNase inkubiert worden waren (Krishan, 1975). Eigene Versuche mit dem Durchflußzytometer zeigten keine qualitativen Unterschiede zwischen einer Anfärbung toter Zellen mit dem DNS-spezifischen Farbstoff Mithramycin oder mit Propidiumiodid. Die Fluoreszenz von Propidiumiodid kann mit demselben Wellenlängenbereich wie DCH (300 - 400 nm) angeregt werden. Das Emissionsmaximum liegt bei 611 nm; entsprechend der Meßanordnung gelangt die Propidiumfluoreszenz nur in den F2-Kanal (Abb. 2a) und kann von der DCH-Fluoreszenz, die von beiden Fluoreszenzmeßbereichen erfaßt wird, abgegrenzt werden. Die spektralen Eigenschaften von DCH werden in Kap. 3.2.1 behandelt.

Für die Messung im Durchflußzytometer wurden dem Ansatz 5 µl Propidiumiodid (2 mg/ml in TBS, Stocklösung bei -20 °C gelagert) zugesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 10 bis 20 Minuten.

2.21 Insulinabhängige Änderungen des intrazellulären pH-Wertes mononukleärer Leukozyten

Insulin:

9 mg (225 U) Insulin (vom Schwein, 1 mg entsprechen 25 U, Nordisk Insulinlaboratorium, Kopenhagen) wurden in 0,5 ml 0,1 N HCl gelöst, mit einer BSA-Lösung (TBS, 0,2 % (G/V) BSA "RIA grade" (Sigma, München, weniger als 0,1 μ U Insulin/mg)) auf 75 mU/ml verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

Für die Inkubation wurde L-15 Medium verwendet. Es war für die Fragestellung gut geeignet, da es aufgrund seiner Zusammensetzung (glucosefrei, aminosäuregepuffert) sowohl eine Inkubation ohne CO_2 -Begasung als auch die Bestimmung einer Glucoseabhängigkeit erlaubte.

2×10^6 mononukleäre Humanleukozyten (gewonnen wie in Abschnitt 2.13.1 beschrieben) in 2 ml L-15 Medium wurden in Plastikreaktionsgefäßen in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. In verschiedenen Ansätzen wurden 40 μ l Insulin (750 mU/ml, Endkonzentration 30 mU/ml) bzw. 40 μ l Glucose (1M, Endkonzentration 5 mM) zugesetzt. Um temperaturabhängige Artefakte zu vermeiden, wurde Glucose oder Insulin erst nach einer 20minütigen Vorinkubation der Zellen bei 37°C zugegeben. Nach 3 bis 20 Minuten gemeinsamer Inkubation wurde die Inkubation durch die Überführung von 250 μ l des Testansatzes in eisgekühlte Reaktionsgefäße gestoppt und für die Messung im Durchflußzytometer 15 Minuten mit ADB inkubiert.

2.22 Indirekte Immunfluoreszenzmessung

- Inkubation mit dem primären monoklonalen Maus-anti-Meer-schweinchenmakrophagenantikörper

$2 - 4 \times 10^5$ Zellen in 50 μ l TBA wurden mit 25 μ l des monoklonalen Antikörpers (Endverdünnung 1/105) in Mikrotiterplatten (mit 96 Kammern, Greiner, Nürtingen) bei 4 °C inkubiert. Nach zwei bis drei Stunden wurden 200 μ l TBA zugegeben, die Platten 5 Min. bei 200 x g (Minifuge 2, Fa. Christ, Osterrode) zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit mit einer Absaugvorrichtung (Eigenbau MPI für Biochemie) entfernt. Die Zellen wurden mit je 200 μ l TBA mit einer 12-Kanal-Pipette (Titertek, Flow, Meckenheim) resuspendiert, bei 200 x g abzentrifugiert und auf die gleiche Weise 3mal mit TBA gewaschen. Die Titration der primären Antikörper ergab, daß die im Meßansatz verwendeten Konzentration im Sättigungsbereich lagen.

- Inkubation mit dem sekundären Antikörper

Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand nur bis auf 50 μ l abgesaugt und die Zellen nach Zusatz von je 10 μ l FITC-markiertem Kaninchen-anti-Maus IgG Serum (Verdünnung 1/40 mit TBA, Endverdünnung 1/240, Fa. Paesel, Frankfurt) resuspendiert. Die Zellen wurden lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert und nach 2 bis 3 Stunden 2mal mit TBS gewaschen. Die verwendete Konzentration des sekundären Antikörpers lag auch im Sättigungsbereich, sodaß die Fluorescein-Fluoreszenzintensität proportional der Zahl antikörperbindender Stellen auf der Zelle war.

- DNS-Messung toter Zellen

Die Zellen wurden nach dem letzten Waschschrift mit 250 μ l

des DNS-Farbstoffes Mithramycin (100 µg/ml Mithramycin, 15 mM MgCl₂ in TBS, Crissman & Tobey, 1974) aufsuspendiert und nach einer 20 bis 30minütigen Inkubation bei 4 °C im Fluvo-Metricell gemessen. Mithramycin ist ein DNS-Farbstoff, der die DNS toter, nicht jedoch lebender Zellen anfärbt. Es besitzt gegenüber Fluorescein (Emissionsmaximum bei 510 nm) eine längerwellige Fluoreszenz, die durch optische Filter von Fluorescein unterschieden wird (Abb. 2c). Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen und Zellen, die mit dem sekundären Antikörper bzw. mit Mithramycin allein oder gemeinsam inkubiert wurden, gemessen. Um die an verschiedenen Tagen erhaltenen Meßergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde die Fluoreszenzintensitätseinstellung des Durchflußzytometers mit FITC-markierten Eichpartikeln vor jeder Meßserie standardisiert.

3.0 ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG

3.1 Messung intrazellulärer pH-Werte

Mit der Entwicklung empfindlicher Meßverfahren wurde in den letzten Jahrzehnten die Bedeutung der Protonenkonzentrationen und -gradienten für die Stoffwechselregulation und Energiegewinnung der Zelle erkannt (Übersicht: Roos & Boron, 1981). Die bisher gebräuchlichen Meßmethoden basieren auf folgenden Prinzipien:

1. direkte Messung durch Einstechen einer pH-sensitiven Mikroelektrode in die Zelle
2. Verteilung schwacher Säuren bzw. Basen über die Zellmembran
3. pH-abhängigen Änderung der photometrischen Absorption oder der zellulären Fluoreszenz
4. Verhalten ^{31}P -haltiger Verbindungen des Cytosols im Magnetfeld (NMR).

Die seit Mitte der 70er Jahre gewonnenen Erkenntnisse lassen sich zusammenfassen (Nuccitelli & Heiple, 1982), daß eine allgemeine Erhöhung der Stoffwechselaktivität (z.B. nach Befruchtung von Seeigelleiern (Johnson et al., 1976), Stimulierung von Lymphozyten (Gerson et al., 1982)) mit einer intrazellulären Alkalinisierung verbunden ist. Ruhende Zellen weisen dagegen ein erniedrigtes Innen-pH auf.

- Mikroelektroden

Die Verwendung pH-sensitiver Glaselektroden erlaubt die wohl sicherste pH_i -Bestimmung. Gleichzeitig kann über eine Referenzelektrode im extrazellulären Milieu das Membranpotential abgelesen werden. Allerdings eignen sich nur Zellen ab einer bestimmten Größe. Ein weiterer Nachteil ist, daß die Zelle verletzt wird, was das pH_i beeinflussen kann.

- Verteilung schwacher Säuren und Basen über die Zellmembran

Das Meßprinzip beruht auf der Tatsache, daß bestimmte schwache Säuren bzw. Basen nur in der undissoziierten Form membranpermeabel sind. Im Gleichgewichtszustand ist somit die undissoziierte Form gleichmäßig über den intra- und extrazellulären Raum verteilt, wogegen die Konzentration des ionisierten Anteils in dem jeweiligen Bereich von dessen pH abhängt. Es wird meistens die ^{14}C markierte schwache Säure 5,5-dimethyl-2,4-oxazolidindion (DMO) verwendet. Das absolute pH_i kann direkt nach dem Massenwirkungsgesetz berechnet werden, wenn das Medium-pH, die Konzentration der ionisierten und nicht ionisierten Form der schwachen Indikatorbase bzw. -säure und das Wasservolumen im intra- und extrazellulären Raum bestimmt wurde und der pK der Indikatorsubstanz bekannt ist. Das Erstellen einer Eichkurve ist also nicht notwendig.

Die Methode beinhaltet aber eine Reihe von Nachteilen: Das gemessene pH_i ist ein statistischer Durchschnittswert aller Zellen im Meßansatz. Weiterhin sind Äquilibrierungszeiten in Abhängigkeit von der Zellart bis zu einer Stunde erforderlich. Messungen an einzelnen Zellen und das Verfolgen rascher pH_i -Änderungen sind nicht möglich. Die zur pH-Bestimmung notwendige Zellzerstörung erlaubt nur eine einzige pH-Bestimmung je Ansatz. Schwache Membranpermeabilitäten der geladenen Form der Indikatorsubstanz und Schwierigkeiten bei der Berechnung des intra- und

extrazellulären Flüssigkeitsraumes ergeben potentielle Fehler (Roos & Keifer, 1982).

- Kernresonanz von ^{31}P

Die Lage des ^{31}P Gipfels in einem NMR Spektrum verschiebt sich wenn ^{31}P protoniert ist. Die NMR ist bisher die einzige Methode, die eine pH_i Messung ohne Verletzung der Zelle und ohne Zusatz von Indikatorsubstanzen zuläßt (Gillies et al., 1982a). Auch Gewebsstücke können untersucht werden. Ein Nachteil ist, daß aufgrund der intrazellulären Strukturierung Kompartimente mit hoher ^{31}P -Konzentration das Resultantensignal beeinflussen. Der oft niedrige Gehalt von ^{31}P in der Zelle erfordert für die Messung von Einzelzellen unphysiologisch dicht gepacktes Zellmaterial bzw. noch den Zusatz phosphathaltiger Verbindungen wie z.B. 2-desoxy-glucose-6-phosphat (Navon et al., 1977).

- Fluoreszenzfarbstoffe

Es sind zur Zeit mehr als 20 Fluoreszenzfarbstoffe bekannt (Weast, 1978), die als pH-Indikatoren in verschiedenen pH-Bereichen geeignet sind. Bis jetzt wurden für Messungen des intrazellulären pH nur solche Farbstoffe verwendet, die durch eine pH-abhängige Änderung der Fluoreszenzintensität charakterisiert sind. So wurden Fluorescein (Thomas et al., 1979, Visser et al., 1979), Methylumbelliferol (Gerson, 1982) und Quene 1 (Rogers et al., 1983) für pH_i -Bestimmungen (z.T. auch mit einem Durchflußzytometer) eingesetzt. Diese Substanzen wurden verestert, um eine gute Membranpermeabilität und intrazelluläre Anreicherung zu erzielen. Da die gemessene Fluoreszenzintensität neben dem pH_i noch von der zellulären Esteraseaktivität, der Membranpermeabilität des Farbstoffes und der Zellgröße abhängt, waren aufwendige Meßbedingungen (z.B. Zweistrahanregung) erforderlich, um

genaue pH-Werte zu erhalten.

Eine einfache Meßanordnung mit einem einzigen Anregungslicht wäre möglich bei der Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes, dessen pH-Abhängigkeit auf einer Änderung der Farbe des emittierten Lichtes beruht. Die Anregung der Substanz könnte dann in einem Wellenbereich und die simultane Messung der Emission z.B. im blauen bis gelben Teil des Spektrums erfolgen. Eine Substanz, die diese Bedingungen erfüllt, ist Dicyan-hydrochinon, das in unserer Arbeitsgruppe erstmals für zelluläre pH_i -Bestimmungen eingesetzt wurde (Valet et al., 1981). Es ändert im physiologisch interessanten pH-Bereich zwischen pH 5 und 9 seine Fluoreszenzfarbe von blau nach grün (Weast, 1978). Es ist nicht zelltoxisch. Der große Vorteil dieser Substanz besteht darin, daß die durchflußzytometrische pH-Messung auf Einzelzellniveau mit nur einer Lichtquelle (Quecksilberlampe, Kryptonlaser) möglich ist, was mit den bisher verwendeten Substanzen nur mit Einschränkung durchführbar war. Wegen dieser Vorzüge sollten die Bedingungen zur Anfärbung zur Eichung des intrazellulären pH jetzt genauer untersucht werden.

3.2 Durchflußzytometrische Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes von Einzelzellen mit DCH als Fluoreszenzindikator

Thiele und Meisenheimer synthetisierten erstmals im Jahr 1900 Dicyan-hydrochinon (Abb. 3) und erkannten dessen pH-abhängige Fluoreszenzeigenschaft (Thiele & Meisenheimer, 1900): "Die wässrige Lösung zeigt schwach blaue Fluoreszenz, die durch Leitungswasser sehr stark himmelblau, durch Säuren schwach violett wird. In Alkalien, auch Soda, löst sich der Körper leicht mit gelber Farbe und sehr starker, grüner Fluoreszenz."

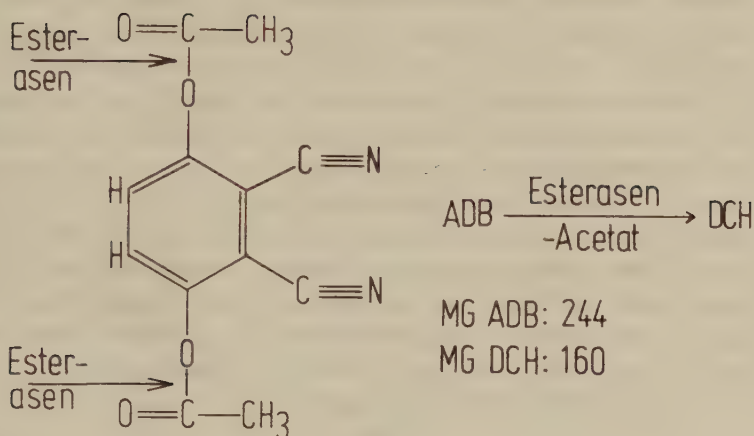


Abb. 3: Strukturformel von ADB und DCH.

Die durch zwei substituierte Cyangruppen bedingte Fluoreszenz wird durch den pH-abhängigen Dissoziationsgrad der beiden Hydroxylgruppen verändert. Im physiologischen pH-Bereich liegt DCH in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen seiner mono- und dianionischen Form vor, die jeweils durch ein eigenes Emissionswellenlängenmaximum charakterisiert ist. Werden lebende Zellen mit DCH inkubiert, so erscheinen sie im Fluoreszenzmikroskop als dunkle Punkte auf blauem Hintergrund. DCH ist also bei physiologischem pH nicht membrangängig, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die beiden Hydroxylgruppen der Verbindung infolge Dissoziation partiell geladen sind.

Zur Verbesserung der Membrangängigkeit wurde die Verbindung von Prof. L. Moroder und Prof. E. Wünsch, Max-Planck-Institut für Biochemie, mit Essigsäure verestert. Diese Verbindung, das Diacetoxy-dicyanbenzol (ADB, Abb. 3) war bereits früher im Rahmen ihrer synthetischen organisch-chemischen Arbeiten von Thiele (Thiele & Günther, 1906) synthetisiert worden. Eine genaue Bestimmung der spektralen Eigenschaften wurde damals nicht durchgeführt. ADB ist, wie die eigenen Versuche zeigen, für Zellen gut membranpermeabel, wo intrazelluläre Esterasen das polare DCH freisetzen, welches sich in wenigen Minuten in lebenden Zellen anreichert. Im Fluoreszenzmikroskop sind lebende Zellen gleichmäßig gefärbt, eine Anreicherung in Lipiden, Vakuolen oder toten Zellen wurde nicht beobachtet. Die Färbecharakteristik ähnelt der zytoplasmatischen Färbung lebender Zellen, wie sie z.B. mit FDA beobachtet wird.

3.2.1 Spektrale Eigenschaften von DCH und ADB

DCH:

Die spektralen Eigenschaften von DCH wurden erst 1977 im Hinblick auf den Einfluß des pH auf cyan-substituierte Hydrochinone näher untersucht (Brown & Porter, 1977). Nach diesem Bericht kann DCH in Abhängigkeit vom pH als Dianion, Anion, neutrale und wahrscheinlich auch als protonierte Form vorliegen. Diese Formen sind durch eigene Absorptions- und Emissionsmaxima charakterisiert (Tab. 2, Abb. 7).

Tabelle 2: Spektrale Daten von DCH

Form	Meßbe- dingung	Wellenlängenmaximum (nm)	
		Exzitation	Emission
protoniert		n.b. (285) ¹⁾	n.b. (--)
neutral	HCl 37 %	345 (345)	399 (400)
	pH 0	344	427 (428)
	pH 1	345	445
Monoanion	pH 5	347	446
	pH 6	384 (380)	448 (450)
	pH 7	386	451
	pH 7,5	387	456
	pH 8	390	463
	pH 9	400	471
Dianion	pH 10	401 (405)	473 (480)
	pH 13	402	472
	pH 14	401	473

¹⁾ Die eingeklammerten Werte sind die von Brown & Porter (1977) unter ähnlichen Bedingungen erhaltenen Daten.

Der Emissionsgipfel der neutralen Form des DCH liegt in 37 %iger HCl bei 399 nm. Bei pH 0 erscheint unter gleichzeitiger Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Abb. 4b, 6a) um das 3fache ein weiterer Emissionsgipfel bei 427 nm. Zwischen pH 1 und 14, also zwischen der mono- und dianionischen Form, ist nur der zweite Emissionsgipfel vorhanden, der sich stufenlos von 445 auf 471 nm verschiebt. Die Fluoreszenzintensität ist uneinheitlich. Bezogen auf den Wert in 37 %iger HCl nimmt sie bei pH 1 und 5 um das 5fache, bei pH 6 dagegen nur um das 4,4fache, erreicht bei pH 7 den höchsten Wert (5,5fach) und geht bis pH 14 auf 60 % der maximalen Fluoreszenz zurück.

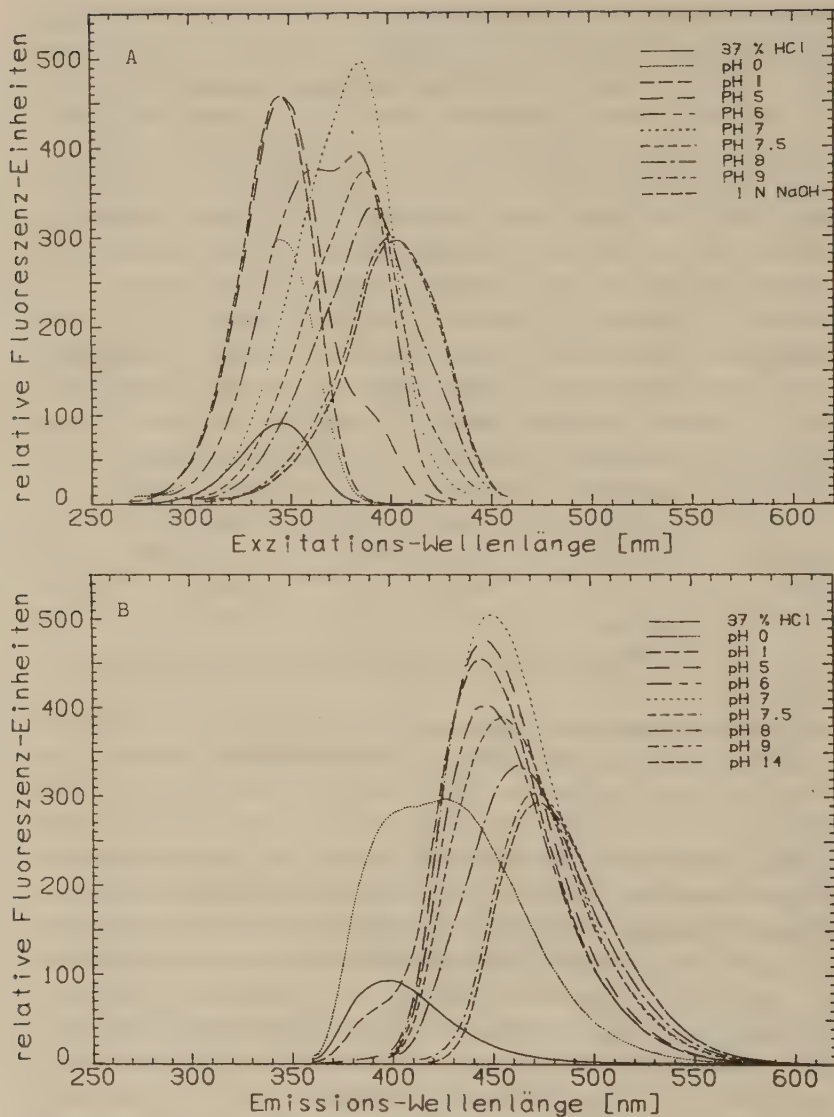


Abb. 4: Fluoreszenz-Exzitations- (A) und Emissionsspektren (B) von DCH ($2,1 \times 10^{-6}$ M) bei verschiedenen pH-Werten (37 % HCl, 1 N HCl, 0,1 N HCl, KPG-Puffer pH 5 - 10, 1 N NaOH). Die Exzitationspektren wurden bei der Wellenlänge der maximalen Emission und die Emissionsspektren bei der Wellenlänge der maximalen Exzitation gemessen.

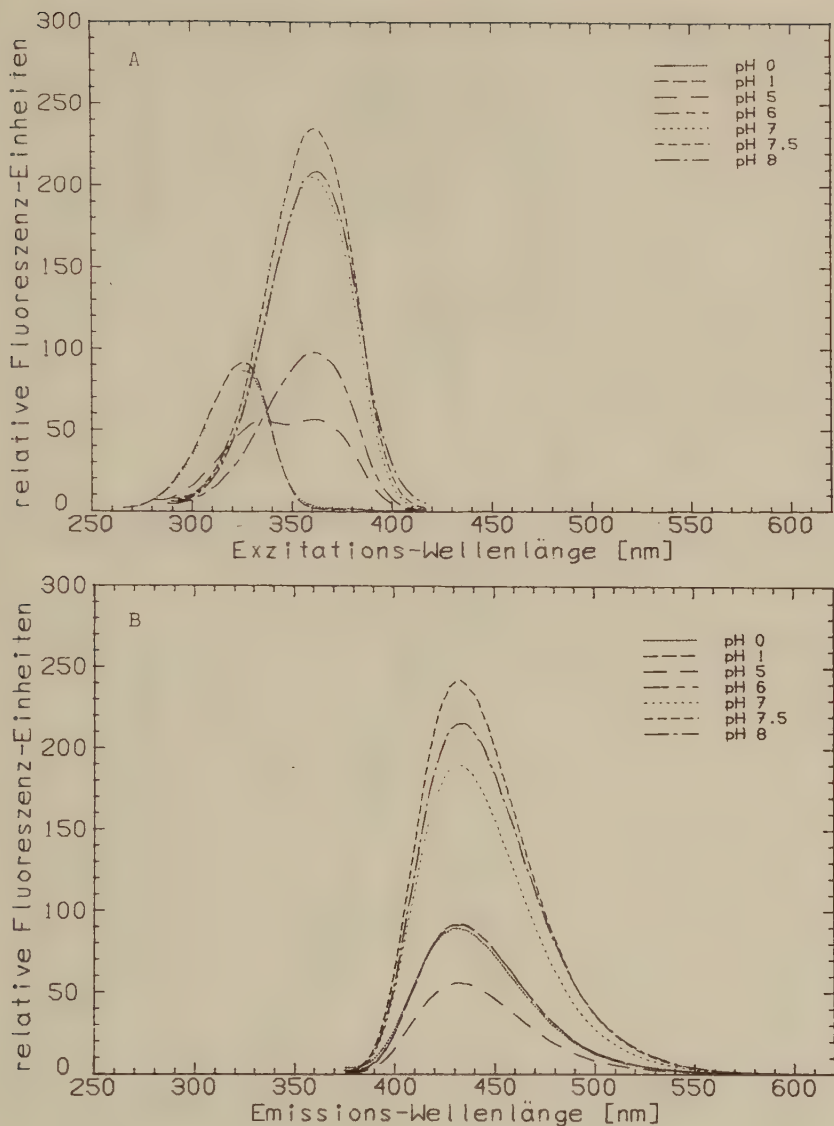


Abb. 5: Fluoreszenz-Exzitations- (A) und Emissionsspektren (B) von ADB ($1,3 \times 10^{-6} \text{M}$) bei verschiedenen pH-Werten (1 N HCl, KPG-Puffer pH 5 - 8). Die Exzitationsspektren wurden bei der Wellenlänge der maximalen Emission und die Emissionsspektren bei der Wellenlänge der maximalen Exzitation gemessen.

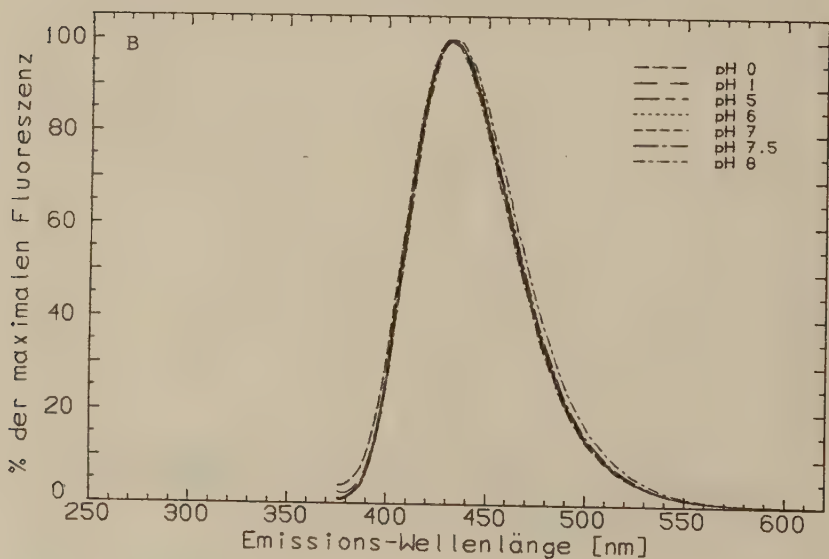
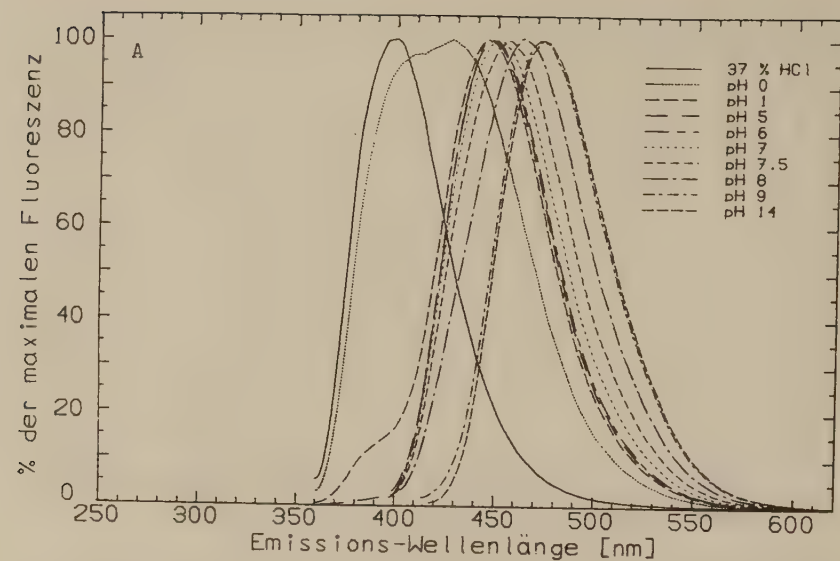


Abb. 6: Vergleich der Emissionsspektren von DCH (A) und ADB (B). Die Kurven wurden auf die maximale Fluoreszenz standardisiert, es liegen ihnen die Messwerte von Abb. 4b und 5b zugrunde.

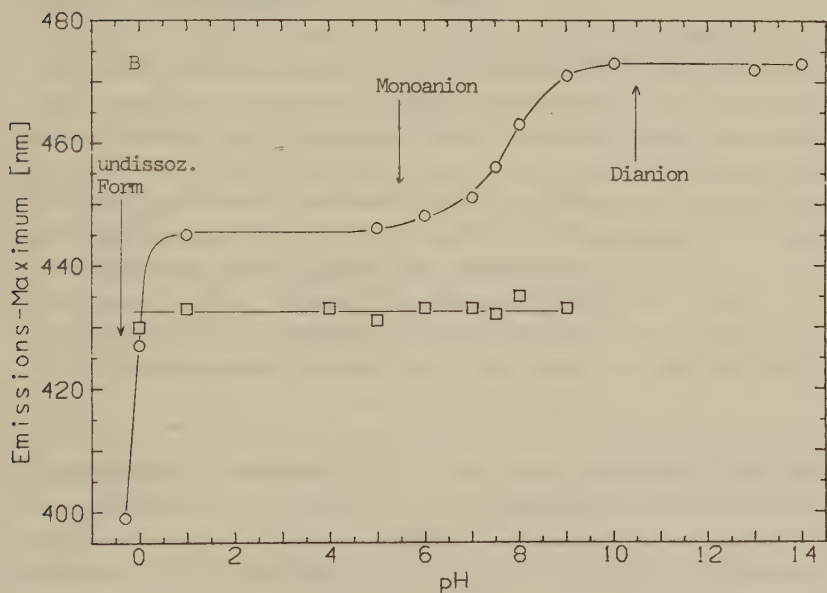
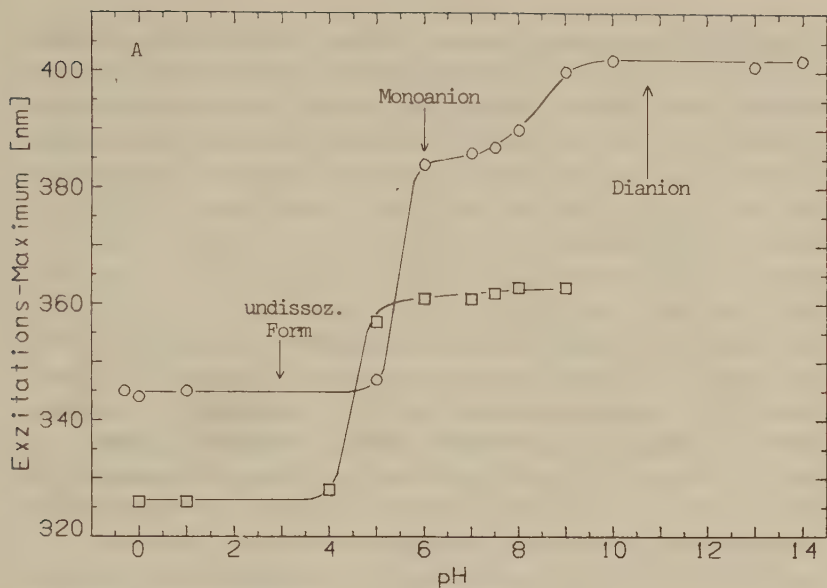


Abb. 7: Exzitations- (A) und Emissionsmaxima (B) von DCH (O) und ADB (□) bei verschiedenen pH-Werten.

Die Fluoreszenzexcitations- bzw. Absorptionsspektren (Abb. 4a) verhalten sich gegenüber den Emissionsspektren dagegen nur teilweise analog. So ist das Exzitationsmaximum zwischen 37 %iger HCl und pH 5 bei 345 nm unverändert. Erst bei pH 6 nimmt dieser Gipfel ab und wird durch einen neuen bei 384 nm ersetzt, der sich analog zur Emission bis pH 14 auf 400 nm verschiebt.

ADB:

ADB wurde seit seiner Erstsynthese im Jahr 1906 nicht weiter untersucht. Es ist bereits als Ester fluoreszent und kann daher nicht im strengen Sinn als ein fluorogenes Substrat wie z.B. Fluoresceindiacetat (FDA, Rotman & Papermaster, 1966) bezeichnet werden. Ein fluorogenes Substrat sollte in der Esterform nicht fluoreszieren, sondern erst nach einer enzymatischen Freisetzung des fluoreszierenden Anteils des Gesamtmoleküls. Die Anwesenheit von ADB im Meßansatz stört eine pH_i -Messung nicht, da es eine pH-unabhängige und in einem anderen Wellenlängenbereich liegende Emission als DCH aufweist (Abb. 7b) und in den Zellen im Gegensatz zum abgespaltenen DCH nicht anreichert. Die Lage des Emissionsmaximums bleibt zwischen pH 0 und pH 8 bei etwa 433 nm unverändert (Tabelle 3). Bei Werten über pH 8 hydrolysiert ADB bereits nach wenigen Minuten spontan zu DCH und Essigsäure. Im Gegensatz zu den konstanten Emissionseigenschaften sind die Fluoreszenzexcitations- bzw. Absorptionsspektren von ADB (Abb. 5) pH-abhängig. Unter pH 6 liegt ein Absorptionsgipfel bei 300. Über pH 6 baut sich ein zweiter Gipfel bei 360 nm auf, wobei der erstere verschwindet.

Die Intensität der Fluoreszenz von ADB hat bei pH 7,5 ein Maximum, welches etwa 60 % der maximalen Fluoreszenzintensität von DCH bei pH 7 entspricht (Abb. 5b). Die dargestellte Fluoreszenz wurde ca. 10 Minuten nach Überführung von ADB aus dem DMF-Milieu in wässrige

Pufferlösung erreicht. Sie nimmt die ersten 10 Minuten zu und bleibt dann unterhalb pH 7 stabil, oberhalb pH 7 nimmt sie ab. Sofort nach Verdünnen beträgt die maximale Fluoreszenz des ADB bei pH 7,5 nur die Hälfte der nach 10 Minuten erreichten.

ADB kann leicht in alkalischem Milieu (1 Min. in 0,2 N NaOH, mit 0,2 N HCl neutralisiert) oder enzymatisch (Rattenleberextrakt 100.000 x g Überstand, 50 µg Protein/ml, 10 Min. 37 °C) hydrolysiert werden. Das entstandene Produkt hat die gleichen spektralen und dünnenschichtchromatischen Eigenschaften wie DCH (DC-Fertigplatten (Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator, Merck, Darmstadt), Laufmittel Methanol : Essigsäureester : Methylenchlorid 1 : 2 : 3, 60 min, 4 °C).

Tabelle 3: Spektrale Daten von ADB

Meßbedingung	Wellenlängenmaximum (nm)	
	Exzitation	Emission
pH 0	326	430
pH 1	326	433
pH 5	357	431
pH 6	361	433
pH 7	361	433
pH 7,5	362	432
pH 8	363	435

3.2.2 pH-Messung im Fluvo-Metricell

Die DCH-Fluoreszenz wurde zwischen 300 und 400 nm mit dem Licht einer HBO-100 Quecksilberhochdrucklampe (Osram) angeregt und durch optische Filter (s. Abb. 2a, Kap. 2.20.2) in zwei verschiedene Wellenlängenbereiche (F1: 420 - 440 nm, F2: 500 - 700 nm) aufgespalten. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von F1 und F2 war pH abhängig. Es wurde bei alkalischem pH kleiner und bei saurem pH größer.

3.2.2.1 Auswertung der pH-Messung

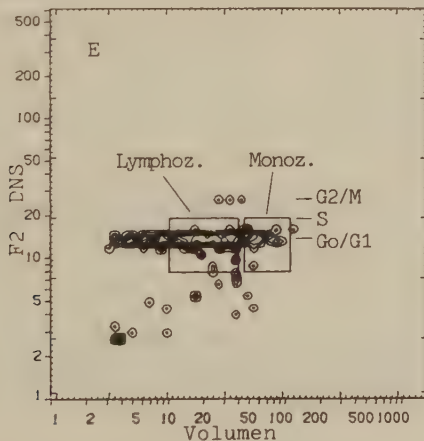
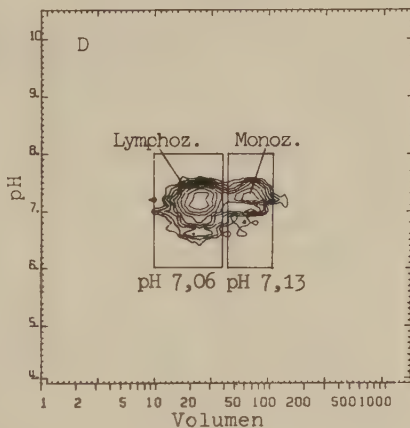
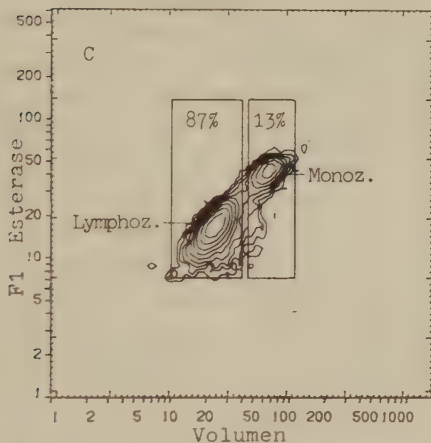
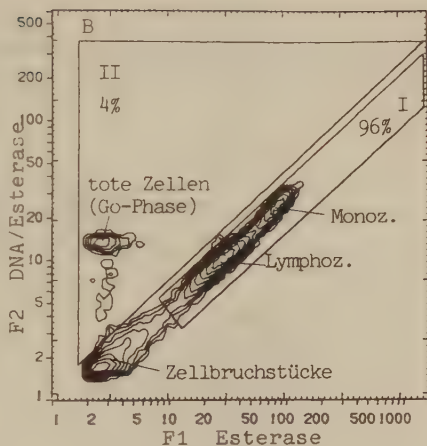
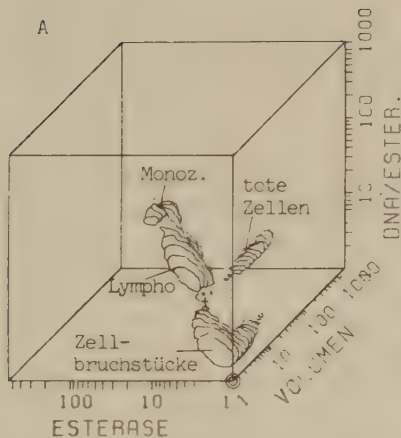
Im folgenden werden die Ergebnisse einer Dreiparametermessung mit ADB und Propidiumiodid dargestellt. In einem Beispiel werden mononukleäre Leukozyten (MNL) des Menschen untersucht.

- Dreiparameterdarstellung (Abb. 8a):

Jeder Achse des Würfels ist ein Parameter zugeordnet wie Volumen, Esteraseaktivität (F1) und Esteraseaktivität bzw. DNS der toten Zellen (F2). Die gemessenen Partikel erscheinen in Bezug auf ihre Eigenschaften als Wolken. Die Konturlinien beziehen sich auf eine definierte Amplitude der gemessenen Partikelzahl. In dieser Berechnung wurde

Abb. 8: Verschiedene Auswertungen einer 3-Parameter-Fluvo-Metricell-Messung von MNL (Mensch), die mit ADB und Propidiumiodid angefärbt wurden.

Dreiparameterhistogramm (A). Zweiparameterprojektionen (B) - (E): tote/lebende Zellen (B), Esteraseaktivität lebende Zellen (C), pH, lebende Zellen (D), DNS tote Zellen (E). Die logarithmische Skalierung der Esterase- und DNS-Skalen ist dimensionslos, sie soll lediglich einen Hinweis auf den Meßumfang geben. Eine logarithmische Einheit auf der Zellvolumenachse entspricht $13 \mu\text{m}^3$. Es wurden 24.576 Partikel gemessen.



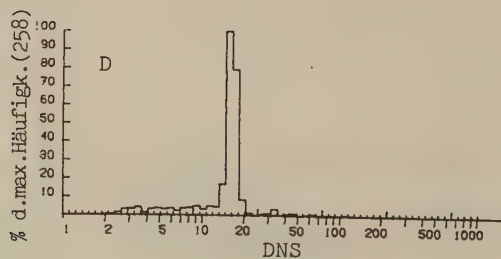
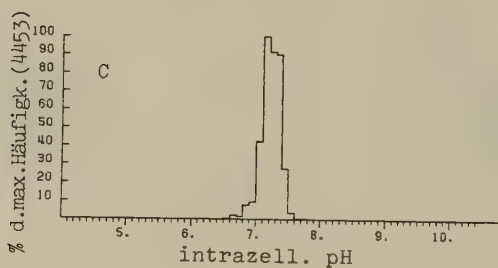
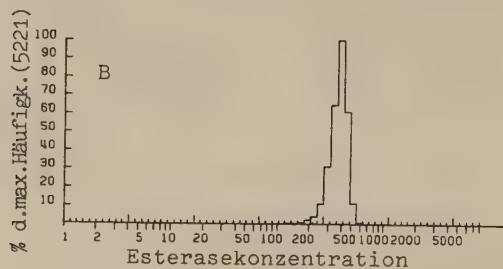
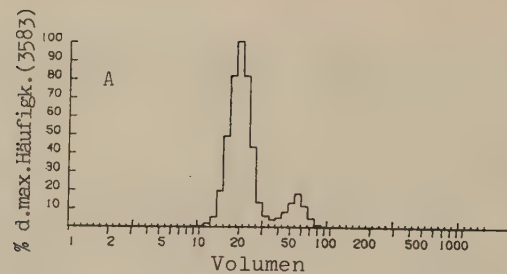


Abb. 9: Einparameterhistogramme der Messung von Abb. 8. Volumen (A), Esterasekonzentration, berechnet aus Esteraseaktivität/Zellvolumen jeder Zelle (B), pH-Verteilung (C), DNS der toten Zellen (D).

auf 20 % der maximalen Amplitude begrenzt, d.h. die Konturlinien umfahren Bereiche, die 80 % aller gemessenen Partikel erfassen.

- Zweiparameterhistogramme (Abb. 8b-e):

Sie werden erhalten durch die kummulierte Projektionen des Dreiparameterhistogrammes auf die Volumen-F1, Volumen-F2, und F1-F2 Ebene, oder durch die Darstellung Volumen gegen das Verhältnis der beiden Fluoreszenzen. Zur Darstellung der Zellzahl werden die Klasseninhalte logarithmiert und der maximale logarithmische Klasseninhalt in 10 gleiche Stufen unterteilt, für die Isoamplituden (Höhenlinien) ausgezeichnet werden. Der Amplitudenbereich umfaßt 3 logarithmische Dekaden. In Abb. 8b ist ein Histogramm gezeigt, das durch die Projektion der Daten auf die F1-F2-Ebene entstand. Aus diesem Histogramm kann der Anteil lebender und toter Zellen berechnet werden.

Da bei einer 3-Parameteraufzeichnung die Werte jeder Zelle einzeln gespeichert wurden, ist es möglich, die weitere Auswertung auf solche Zellen zu beschränken, die im F1-F2-Histogramm in der Fläche I (lebende Zellen) oder in der Fläche II (tote Zellen) liegen. Abb. 8c stellt die Esteraseaktivität (Volumen-F1-Histogramm) der lebenden Lymphozyten und Monozyten dar. Nach der Fluoreszenzintensität besitzen Monozyten (0,49 Einheiten) im Mittel eine deutlich höhere Enzymaktivität als Lymphozyten (0,22 Einheiten). Berechnet man für jede Zelle die intrazelluläre Farbstoffkonzentration, welche aus dem Verhältnis F1/Zellvolumen ermittelt wird, so zeigt sich, daß die Esterasekonzentrationen der Monozyten dagegen niedriger als die der Lymphozyten ist (0,33 bzw. 0,41 rel. Einheiten).

In Abb. 8d ist das pH_i dargestellt, welches aus dem F1/F2-Verhältnis über eine Eichkurve (s. Kap. 3.3) abgeleitet wurde. Lymphozyten und Monozyten weisen im

Mittel ein pH_i von 7,06 bzw. 7,13 auf.

Das DNS-Profil der toten Zellen (Volumen-F2) ist in Abb. 8e dargestellt.

- Einparameterhistogramme (Abb. 9):

Sie entstehen durch Projektion von 2-Parameter-Histogrammen auf eine Achse. In Abb. 9a ist die Volumenverteilungskurve des Volumen-F1-Histogramms der lebenden Zellen, in Abb. 9b die Esterasekonzentration, in Abb. 9c die pH-Verteilung lebender Zellen aus Abb. 8d und in Abb. 9c die DNS-Verteilung des Volumen-F2 Histogramms (Abb. 8c) der toten Zellen dargestellt.

3.2.2.2 Abhängigkeit des intrazellulären pH-Wertes von Farbstoffkonzentration und Inkubationsdauer

Die intrazelluläre Anreicherung von DCH hängt von der zellulären Esteraseaktivität und von der extrazellulären ADB-Konzentration ab. Es wurde untersucht, inwieweit die gemessene intrazelluläre Farbstoffkonzentration das F1/F2-Verhältnis bzw. das daraus abgeleitete pH_i von der im Meßansatz angebotenen ADB-Konzentration und der Inkubationszeit beeinflusst wird.

Aus Abb. 10a geht hervor, daß bei einer ADB-Konzentration im Meßansatz zwischen 1,6-6 und 0,04 mM die intrazelluläre Farbstoffkonzentration von Rattenknochenmarkszellen konstant bleibt, dann aber nach weiterer Verdünnung bis 0,0004 mM auf 17 % der maximalen intrazellulären Konzentration zurückgeht. Das pH_i bleibt dagegen mit $\text{pH } 7,3 \pm 0,03$ über den gesamten Konzentrationsbereich unverändert. Somit wurde bei hohen ADB-Konzentrationen keine messbare Ansäuerung der Zellen beobachtet, obwohl bei der Hydrolyse von 1 Mol ADB 2 Mole Essigsäure freigesetzt werden, und DCH intrazellulär angereichert wird. Als allgemeine Meßbedingung wurde eine ADB-Konzentration von 0,08 mM (bzw. 20 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt.

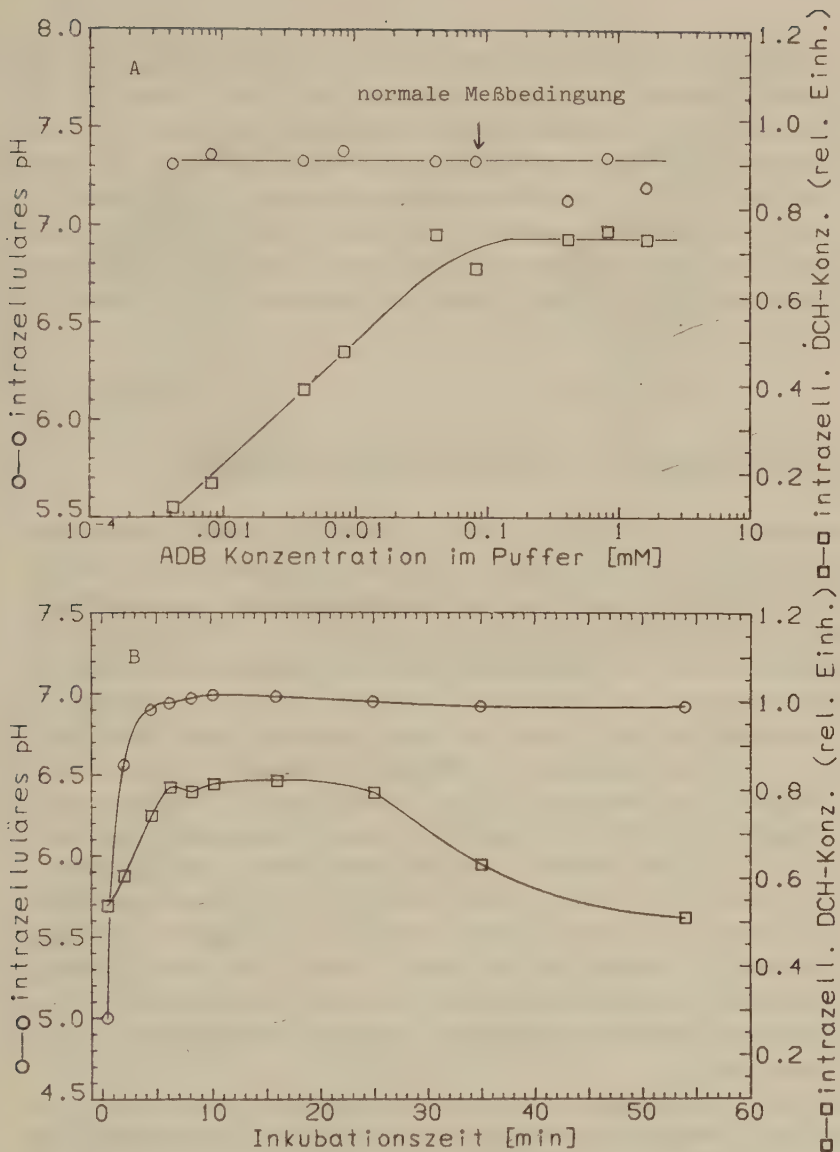


Abb. 10: Abhängigkeit des pH_i (○) und der intrazellulären Farbstoffkonzentration (□) von der extrazellulären ADB-Konzentration (A) und von der Inkubationszeit (B). Knochenmarkzellen von der Ratte wurden in TBS-Puffer 10 Minuten mit 0,0004 – 1,6 mM ADB (A) bzw. 0,5 – 54 Minuten mit 0,08 mM ADB (B) bei RT inkubiert.

Unmittelbar nach Farbstoffzugabe wird durch unvollständig hydrolysiertes ADB ein niedriges pH (bis unter pH 5) vorgetäuscht (Abb. 10b). Daher sollten die Zellen vor der Messung 5 bis 10 Minuten mit ADB inkubiert werden. Die intrazelluläre Farbstoffkonzentration erreicht in Abhängigkeit von der Esteraseaktivität nach 15 Minuten ein Plateau und nimmt nach 20 Minuten ab. Ähnliche Befunde wurden mit Fluorescein- und Umbelliferonestern erhalten (Malin-Berdel & Valet, 1980).

3.2.2.3 Messung der zellulären Esteraseaktivität

Esterasen sind Enzyme, die aliphatische und aromatische Ester hydrolysieren können. In Blutzellen wurden mindestens drei Gruppen von Esterasen charakterisiert, die sich in ihrer Substratspezifität und Hemmbarkeit unterscheiden (Li et al., 1973). So wurde eine nicht NaF-hemmbar Chloracetat-esteraseaktivität (Substrat: Naphtol AS-D Chloracetat) in neutrophilen Granulozyten und eine "unspezifische" NaF-hemmbar Esteraseaktivität (Substrat α -Naphtyl-acetat bzw. -butyrat) in Monozyten und Makrophagen nachgewiesen. Grundsätzlich besitzt aber jede Zellart Esteraseaktivität. So wird die Hydrolyse von FDA durch Esterasen und die intrazelluläre Anreicherung von Fluorescein als Kriterium für die Vitalität der Zelle verwendet (Rotman & Papermaster, 1966). In Abb. 11 werden ADB (20 μ g/ml) angefärbten Knochenmarkszellen der Ratte (Färbezeit 10 Minuten) FDA-gefärbte Zellen (4 μ g/ml, gleiche Färbezeit) derselben Präparation gegenübergestellt.

Um die Esterasemuster direkt miteinander vergleichen zu können, wurde in einer Zweiparametermessung im Fl-Kanal das gesamte Fluoreszenzlicht von FDA (Anregungsfilter s. Abb. 2c) oberhalb 500 nm und von ADB (Anregungsfilter s. Abb. 2a) oberhalb 420 nm gesammelt. Die Esterasemuster sind

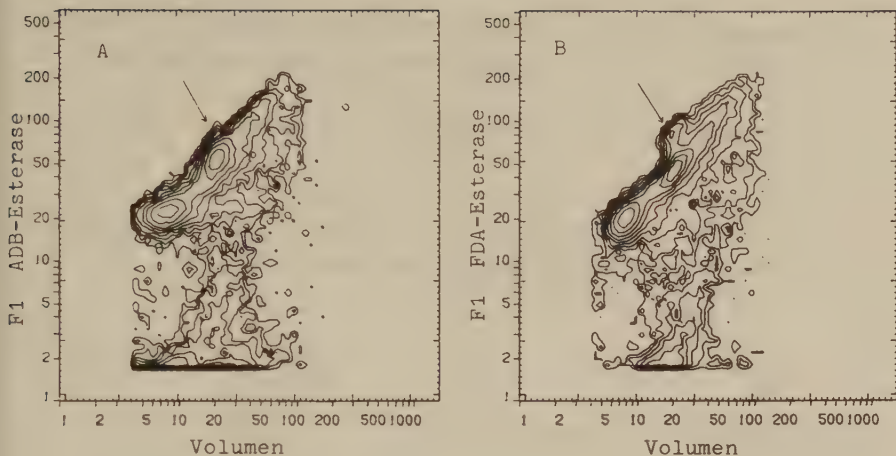


Abb. 11: Histogramme der intrazellulären Esteraseaktivität von Rattenknochenmarkszellen, die mit 20 µg/ml ADB (A) bzw. 4 µg/ml FDA (B) angefärbt wurden. Der Pfeil deutet auf die Granulozyten. Eine logarithmische Einheit auf der Zellvolumenachse entspricht 13 µm³.

für beide Färbungen ähnlich, jedoch werden mit FDA die Granulozyten (Pfeil) von anderen Zellen deutlich herausgehoben.

3.3 Bestimmung des absoluten intrazellulären pH-Wertes mit DCH

Die Bestimmung des absoluten pH_i mit DCH erfordert die Erstellung einer Eichkurve. Dazu wurden drei Verfahrenswesen entwickelt:

- Messung des Fluoreszenzverhältnisses F_1/F_2 von DCH welches in Puffern verschiedener pH Werte gelöst war,
- Messung mit gefärbten porösen, monodispersen Latexpartikeln,
- Messung mit Zellen, bei denen das pH_i dem extrazellulären pH angeglichen wurde.

3.3.1 pH-Eichung im Gleichlicht

Mit diesem Verfahren wurde der mit dem Fluvo-Metricell meßbare pH-Bereich bestimmt und eine Beeinflussung löslicher Substanzen auf die DCH-Fluoreszenz untersucht. Dazu wurde eine farbstoffhaltige Lösung auf die gleiche Weise wie eine Zellsuspension im Gerät gemessen. Die von der beleuchteten DCH-Lösung emittierte Fluoreszenz wurde von Photoröhren verstärkt und ihre Intensität an der Gleichspannung am Photoverstärkerausgang mit zwei Voltmetern abgelesen. Die optischen Verstärker wurden bei der gleichen Einstellung wie zur Zell-pH Messung verwendet. Auf diese Weise ist eine zellunabhängige Eichung der DCH-Methode gegeben, welche für jedes Durchflußzytometer einfach durchgeführt werden kann.

In Abb. 12a ist die über Gleichlichtmessungen ermittelte Eichkurve dargestellt.

Zwischen pH 5 und 9 verringert sich das F_1/F_2 Verhältnis von 3,6 auf 0,45, also auf $1/8$ des Verhältnisses bei pH 5, d.h. es ist von der Substanz her die Möglichkeit zu einer empfindlichen pH-Messung in diesem Bereich gegeben. Die veresterte Form des Indikators lag mit einem über den gesamten pH-Bereich unveränderten F_1/F_2 -Verhältnis von etwa 6 deutlich über der DCH-Kurve. Bei längerer Inkubation im alkalischen (über pH 8) nahmen die F_1/F_2 -Verhältnisse ab.

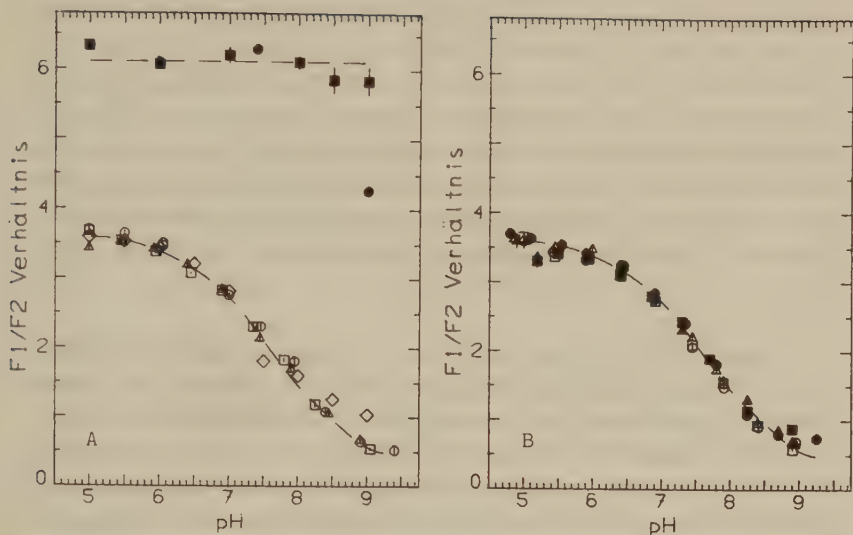


Abb. 12: Verhältniswerte ($F1/F2$) des Fluoreszenzgleichlichtanteils der Photoröhren (PM, Abb. 3a) von DCH und ADB (jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$) in TPS-Puffer pH 5 - 9 (A) und in Anwesenheit von Protein, Polykationen bzw. -anionen (B).
 Zu A: Konstanz der DCH-Meßwerte an verschiedenen Tagen (○), (□), (△). ADB sofort nach Verdünnen im Puffer (■) oder 40 Min. später (●). $F1/F2$ -Verhältniswerte von DCH ($F1=420-440\text{nm}$, $F2=500-600\text{nm}$) aus den Emissionsspektren planimetrisch berechnet (Abb. 4b) (◇).
 Zu B: DCH mit Polylysin (○), Polyornithin (□) Protaminsulfat (△) und BSA (◇) (jeweils 0,2 mg/ml) und Heparin (●) (30 U/ml). ADB (■) und DCH (▲) nach einer Inkubation mit Rattenleberextrakt.

Dies war auf die beginnende Spontanhydrolyse des ADB zurückzuführen. Das $F1/F2$ -Verhältnis setzte sich aus dem Fluoreszenzverhältnis des gebildeten DCH und des noch ungespaltenen ADB zusammen.

Die $F1/F2$ -Verhältnisse von DCH und deren pH-Abhängigkeit wurde neben der Gleichlichtmessung auch aus den Emissionsspektren bestimmt. Dazu wurde der Flächeninhalt des

Spektrums von 420 - 440 nm durch den von 500 - 600 nm dividiert. Die F1/F2-Verhältnisse veränderten sich über den pH-Bereich pH 5 bis 9 ebenfalls um das 8fache, allerdings lagen sie insgesamt niedriger. Diese Berechnung kann die durch Gleichlichtmessungen erhaltenen Werte nicht ersetzen, da die Einstellung und Charakteristik der Photoröhren und der optischen Filter nicht berücksichtigt werden kann. Sie gibt nur einen Hinweis auf den theoretisch möglichen Meßbereich.

Um abzuklären, ob das spektrale Verhalten von DCH durch eine Wechselwirkung mit Zellinhaltsstoffen beeinflusst werden könnte, wurden Gleichlichtmessungen in Gegenwart verschiedener Substanzen durchgeführt (Abb. 12b). Weder positiv geladene basische Proteine wie Protaminsulfat, Polylysin, Polyornithin (0,2 mg/ml) oder saure Polymere wie Heparin (30 U/ml) veränderten die F1/F2-Werte. Auch der Zusatz von Rattenleberextrakt beeinflusste die spektralen Eigenschaften nicht. Mit Rattenleberextrakt hydrolysiertes ADB bzw. unter den gleichen Bedingungen behandeltes DCH unterschieden sich nicht von DCH in reinem Puffer. Dazu wurden 12,5 µl ADB (10 mg/ml) in 250 µl Leberextrakt (s. Kap. 2.18) bei 37 °C inkubiert. Nach 12 Minuten wurden davon 20 µl in 500 µl TPS pH 5 - 9 gegeben und das Fluoreszenzgleichlicht gemessen. Die Proteinkonzentration betrug im Meßansatz 0,5 mg/ml.

Das Gesamtergebnis der Versuche zeigt, daß es möglich ist, eine gerätetypische pH-Eichkurve mit DCH zu erstellen, und daß die spektralen Eigenschaften der DCH-Fluoreszenz von löslichen Polykationen, Polyanionen und Protein nicht nachweisbar beeinflusst wird.

3.3.2 pH-Eichung mit porösen Polymerpartikeln

Es wurde untersucht, ob makromolekulare Strukturelemente die Fluoreszenz von DCH beeinflussen können. In einem Modellsystem wurden 4,88- μm große poröse, freie Amingruppen enthaltende, monodisperse Latexpartikel (Ugelstad & Mørk, 1980) sowie DEAE-Sephrose-, CM-Sephrose- und Sephrosepartikel mit DCH gefärbt. Außerdem wurde die DCH- und ADB-Bindung an Lipidtröpfchen untersucht.

- Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß die positiv geladenen Latexpartikel, ebenso DEAE-Sephrosepartikel DCH gut anreicherten. Die Bindung beruhte wahrscheinlich, wie bei einem Ionenaustauscher, auf Wechselwirkungen der positiven Ladung der Partikel mit dem negativ geladenen DCH. Ungeladene Sephrosepartikel färbten nur schwach an. Negativ geladene CM-Sephrosepartikel schlossen den Farbstoff aus.

- Durchflußzytometer

Untersuchungen mit monodispersen Latexpartikeln

5×10^6 NH_2 -substituierte, poröse, monodisperse Latexpartikel wurden mit DCH (20 $\mu\text{g/ml}$) in 0,5 ml TBS pH 7 1 - 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. 10 μl wurden davon 15 Minuten vor der Messung im Durchflußzytometer in 500 μl Puffer mit oder ohne ADB (20 $\mu\text{g/ml}$) gegeben. Die gefärbten Partikel zeigten zwischen pH 5 und 9 pH-abhängige F1/F2-Werte (Abb. 13a). Allerdings waren sie für gleiches pH niedriger als bei DCH in freier Lösung. Außerdem wurde eine Pufferabhängigkeit beobachtet, die sich auf die Art der pufferwirksamen Substanz, nicht aber auf das gelöste Salz (KCl oder NaCl) bezog. Puffersubstanzen mit einem Molekular-

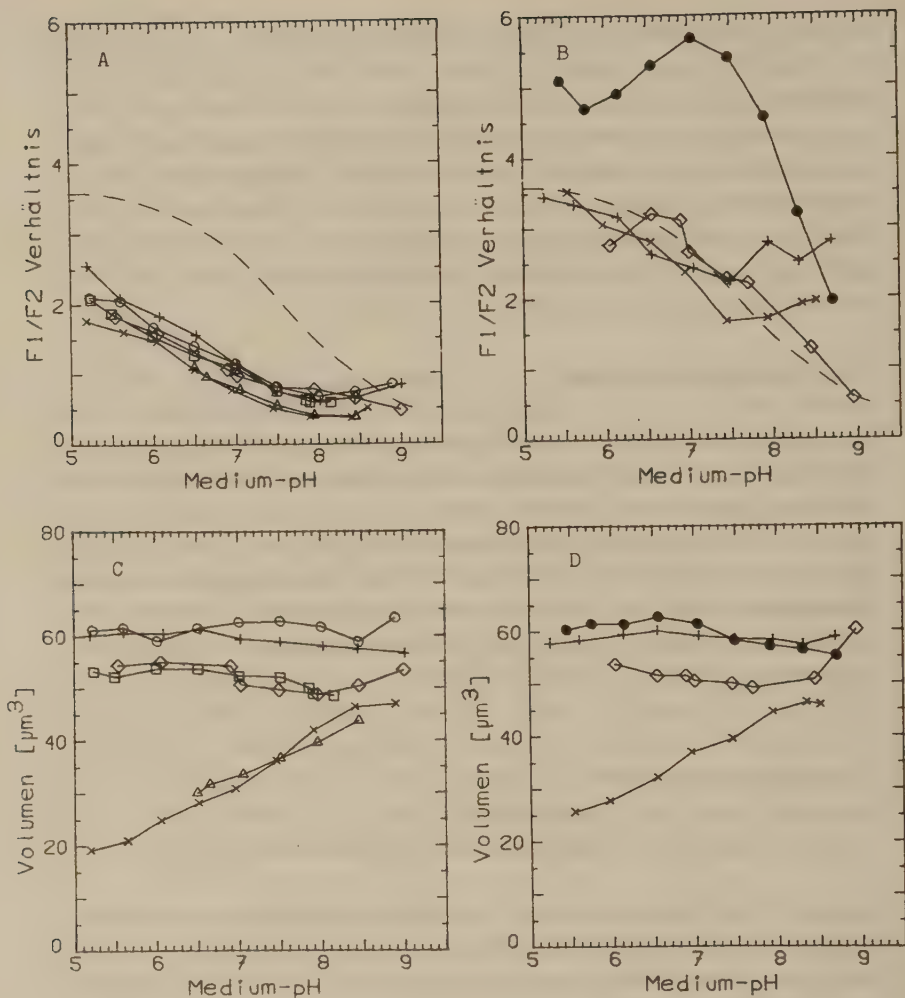


Abb. 13: Mittlere F1/F2 Verhältnisse (A,B) und mittlere Volumina (C,D) von NH_2 -substituierten Latexpartikeln. Sie wurden mit DCH (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gefärbt und nach Verdünnung (1/50) in verschiedenen Puffersystemen bei pH 5 - 9 ohne Zusatz (A,C) oder in Gegenwart von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADB (B,D) gemessen. Es bedeuten KP (□), KPG (○), TPS (+), TBS (Δ), KHEP (x), L-15 (◇), nur mit ADB (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gefärbt und in TPS gemessen (●). Zur Orientierung die Gleichlichtmessung von DCH (gestrichelte Kurve).

gewicht über 120 Dalton wie HEPES oder TRIS (10 mM) erniedrigten die F1/F2 Verhältnisse und führten gleichzeitig zu einer Schrumpfung bis auf etwa 1/3 des ursprünglichen Partikelvolumens (Abb. 13c). Der Zusatz von 10 mM PO_4^{3-} hob die TRIS- bzw. HEPES-induzierten Effekte wieder auf. Die gefärbte Partikel paßten sich in ihrer Fluoreszenz und ihrem Volumen innerhalb von 1 - 2 Minuten den veränderten Außenbedingungen an, unabhängig davon, in welchem Puffer oder bei welchem pH vorinkubiert wurde.

Die Farbstoffkonzentration gefärbter Partikel war bei pH 6 am höchsten. Im alkalischen (pH 8 - 9) nahmen die Partikel nur wenig DCH auf (8 % gegenüber pH 6). Unter pH 6 betrug die Farbstoffkonzentration etwa 60 %. Nach Verdünnen der Suspension mit farbstofffreier Lösung ging die Fluoreszenzintensität im pH-Bereich 5 bis 7 innerhalb von 10 Min. auf 1/3 des Ausgangswertes zurück, d.h. DCH war in reversibler Weise an die Partikel gebunden.

Wurden die Partikel nur mit ADB (4 µg/ml) in TPS-Puffer inkubiert, ergab sich im pH-Bereich 5 - 6,5 eine meßbare Färbungsintensität, die etwa 30 % derjenigen von DCH entsprach. Die F1/F2 Verhältnisse betrugen etwa 6, ähnlich wie bei ADB in freier Lösung (Abb. 13b).

Wenn DCH-gefärbte Partikel in Pufferlösungen mit derselben ADB-Konzentration wie bei Zellmessungen (20 µg/ml) gegeben wurden, lagen die F1/F2 Verhältnisse der Partikel nahezu auf der Gleichlichtkurve (Abb. 13b). Die gemessenen F1/F2-Verhältnisse stellten wahrscheinlich Mischwerte von DCH und ADB dar. Die pH-Abhängigkeit der resultierenden F1/F2 Verhältnisse war also erhalten. Somit können DCH-gefärbte Partikel bei der Bestimmung des intrazellulären pH zur Kontrolle des Medium-pH dem Meßansatz zugegeben werden.

Untersuchungen mit Sepharose-Partikel

Geschwollene Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden) setzt sich aus Kügelchen unterschiedlicher Größe (40 - 160 μm) und Dichte zusammen. Die Gelsuspension wurde 2 Tage in TBS äquilibriert, aufsuspendiert, und die nach 10 Minuten noch schwebenden Partikel durch ein Nylonnetz (100 μm Porendurchmesser, Monodur, Kempten) gegossen und das Filtrat über ein 40- μm Nylonnetz eingeeengt. 10 μl dicht gepackte Partikel wurden in 500 μl KPG, KHEP und TPS bei pH 5 - 9 mit DCH (20 $\mu\text{g/ml}$) eine Stunde lang inkubiert und im Durchflußzytometer mit einer Meßöffnung von 140 μm Durchmesser gemessen. Die F1/F2 Verhältnisse von DCH-gefärbter DEAE-Sepharose waren pH-abhängig. Die resultierenden Kurven lagen zwischen denen der Latexpartikel und der für DCH in Lösung erhaltenen (Abb. 14).

Sepharose zeigte als einziges der untersuchten Polymere nach DCH-Anfärbung höhere F1/F2 Verhältnisse als die Gleichlichtkurve. Es wurde keine Pufferabhängigkeit gefunden. Änderungen des Partikelvolumens in HEPES- bzw. TRIS-Puffern konnten nicht eindeutig bestimmt werden, da die Partikelgröße von Sepharose sehr uneinheitlich war, wodurch die Volumenverteilungskurven der Partikel sehr breit wurden.

Untersuchung von Lipidtröpfchen

Zur Frage, ob DCH oder ADB in Lipidstrukturen anreichern können, was eine zelluläre pH Messung beeinflussen könnte, wurde Fettgewebe aus dem Bauchraum von Ratten in einem Potter-Elvehjem-Glashomogenisator mit TBS-Puffer (1 Teil Gewebe + 5 Teile Puffer) homogenisiert. Dem Homogenat wurde ADB bzw. DCH in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Die Fetttröpfchen waren fluoreszenzmikroskopisch als schwarze Kügelchen auf blauem Grund sichtbar, d.h. DCH und ADB reichern nicht in den Lipiden an.

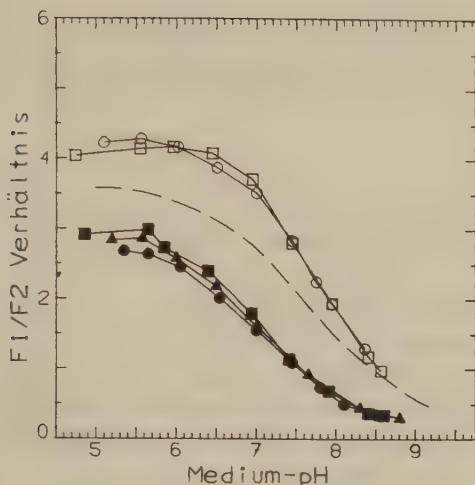


Abb. 14: F1/F2 Verhältnisse von Sepharose- (offene Symbole) und DEAE-Sepharose-Partikeln (geschlossene Symbole), die mit DCH (20 µg/ml) in verschiedenen Puffersystemen bei pH 5 - 9 2 Std. inkubiert wurden. DEAE-Sepharose in KPG (●), KHEP (■) und TPS (▲). Sepharose in KPG (O), KHEP (□). Zur Orientierung die Gleichlichtmessung von DCH (gestrichelte Kurve).

Die Gleichlicht- und Partikelerggebnisse der pH-Eichung lassen sich so zusammenfassen, daß die F1/F2-Verhältnisse von DCH in freier Lösung sich durch Polykationen, Poly-anionen und Protein nicht verändern. DCH reichert sich auch nicht in Lipiden bzw. in hydrophoben Strukturen an. Es kann jedoch in der Nähe hydrophober Grundstrukturen (NH_2 -substituierte poröse Latexpartikel) binden, wenn an diese positive Ladungen gekoppelt sind. Die pH-abhängige DCH-Fluoreszenz bleibt zwar erhalten, die F1/F2 Verhältnisse sind aber - bedingt wahrscheinlich durch die hydrophobe Umgebung - zu niedrigeren Werten verschoben. Bei einer

hydrophilen Grundstruktur (Sepharose) entsprechen die Fl/F2-Werte der DCH-Fluoreszenz annähernd denen der Gleichlichtkurve.

3.3.3 pH-Eichung mit toten Zellen

Es wurde zunächst die Frage untersucht, ob DCH und ADB an zelluläre Strukturen binden, und ob die gemessenen Fl/F2-Verhältnisse gegenüber einer Gleichlichtmessung verändert sind. Dazu wurden tote R3230AC-Kulturzellen (nach der Trypsinierung 5 Tage bei 4 °C in TBS gehalten) mit DCH (20 µg/ml) in KPG-Puffer pH 5 - 8,5 10 Minuten lang inkubiert und im Durchflußzytometer gemessen. Die Zellen waren schwach angefärbt (Farbstoffkonzentration etwa 9 % einer Färbung lebender Zellen mit ADB). Die Fl/F2-Verhältnisse waren pH-abhängig und lagen im Rahmen der Gleichlichtkurve (Abb. 15).

Das pH_i glich allerdings in der 10minütigen Inkubationszeit nicht vollständig dem Medium-pH an. ADB (20 µg/ml) wurde mit einer ähnlichen Intensität wie DCH in den toten Zellen angereichert (etwa 7 % einer Färbung lebender Zellen mit ADB). Das Fl/F2-Verhältnis (4,55) war deutlich höher als das von DCH (je nach pH betrug es 2 - 3,4) und war wie bei ADB in Lösung (Abb. 12) pH-unabhängig.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sowohl DCH als auch ADB in geringem Maß an tote Zellen bzw. Zellbruchstücke binden und die gemessenen Fl/F2-Verhältnisse weitgehend denen der Farbstoffe in Lösung entsprechen. Für die praktische Messung ist die geringe Anfärbung toter Zellen ohne Bedeutung, da sie nur 8 - 12 % der Werte lebender Zellen erzielt. Außerdem wurde die DNS der toten Zellen stets durch Propidiumiodid rot gefärbt, so daß die toten Zellen keine Verfälschungen der Meßergebnisse bringen können. Für die pH-Eichung bedeutet die Ähnlichkeit der Eichkurve des an tote Zellen gebundenen DCH mit der in Abb. 12b ermittelten Kurve für DCH

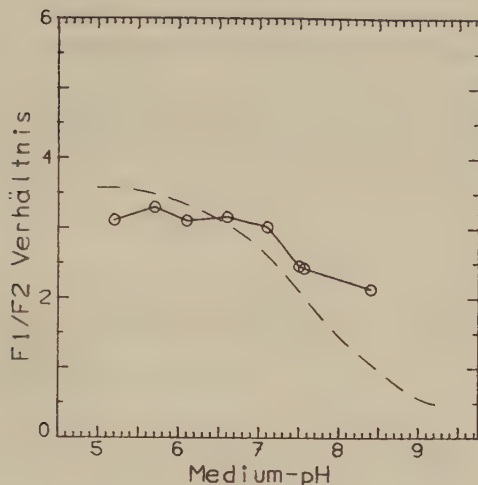


Abb. 15: F1/F2-Verhältnisse toter R3230AC-Zellen, die mit DCH (20 µg/ml) 10 Minuten vor der Messung im Durchflußzytometer in KPG pH 5 - 8,5 inkubiert wurden. Zur Orientierung die Gleichlichtmessung von DCH (gestrichelte Kurve).

in Lösung, daß das DCH hauptsächlich im wässrigen Milieu bzw. in der Nähe hydrophiler Strukturen anreichert. Allerdings könnte dies so sein, weil durch den Zelltod Veränderungen eingetreten sind, die das spektrale Verhalten von angereichertem DCH beeinflussen. Es wurden deshalb weitere Versuche unternommen, um ein geeignetes Eichverfahren für das intrazelluläre pH auszuarbeiten.

3.3.4 pH-Eichung mit lebenden Zellen

3.3.4.1 pH-Angleich lebender Zellen an das Medium-pH

Zunächst wurde geprüft, ob sich der pH_i lebender Zellen an das schwach gepufferte Außenmilieu (10 mM Phosphat, 10 mM Glycin) anpaßt.

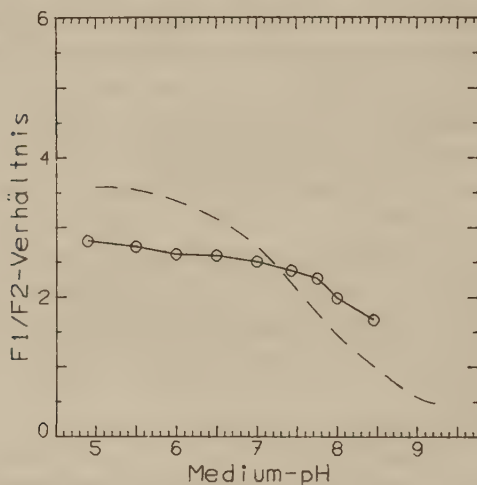


Abb. 16: Peritonealgranulozyten vom Meerschweinchen nach 4-stündiger Inkubation in KPG pH 5 - 8,5. 10 Minuten vor der Messung im Durchflußzytometer wurden 20 $\mu\text{g/ml}$ ADB zugesetzt. Zur Orientierung die Gleichlichtmessung von DCH (gestrichelte Kurve).

In Abb. 16 ist die Gleichlichtkurve den gemessenen F1/F2 -Verhältnissen von lebenden residenten Meerschweinchen-granulozyten aus der Bauchhöhle dargestellt, die in KPG-Puffer pH 4,9 - 8,4 4 Stunden bei RT inkubiert wurden und 15 Minuten vor der Messung mit 20 $\mu\text{g/ml}$ ADB angefärbt

wurden. Bei einer Erniedrigung des Außen-pH um 2,4 oder Erhöhung um 1,1 pH-Einheiten wurden die Zellen nur um 0,6 pH-Einheiten saurer bzw. um 0,5 alkalischer. Lebende Zellen gleichen ihr pH_i dem Medium-pH entgegen der bisher üblichen Auffassung nicht ohne weiteres an, sondern regulieren gegen. Ohne vollständigen Angleich kann aber keine Eichkurve erstellt werden, d.h. es muß der pH-Gradient über die Zellmembran aufgehoben werden.

Zur Aufhebung dieses Gradienten wurden in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben, wie z.B. die Verwendung

- hoher Pufferstärken (Visser et al., 1979)
- hoher Konzentrationen schwacher Säuren oder Basen wie Essigsäure und Ammoniumchlorid (Pollard, 1979)
- von Ionophoren, die einen elektroneutralen K^+-H^+ - Austausch ermöglichen wie Nigericin und X537A, oder Porenbildner wie Gramicidin D (Ohkuma & Poole, 1978; Thomas et al., 1979; Reijngoud et al., 1976).

Für die pH- Eichung im Fluvo-Metricell sollte aus meßtechnischen Gründen die Leitfähigkeit der Zellsuspension nach dem Zusatz von Agenzien nicht erheblich verändert werden, und die Zellmembran noch so erhalten bleiben, daß die Zellen DCH anreichern können und somit eine pH-Messung technisch möglich ist. Daher wurde ein Eichverfahren mit dem Ionophor Gramicidin D entwickelt.

3.3.4.2 pH-Angleich mit Gramicidin D

Gramicidin D, eine Mischung von Gramicidin A, B und C, ist ein lineares Pentadecapeptid mit einer helikalen Tertiärstruktur. Es lagert sich als Dimer in die Membran ein und ermöglicht durch die von den beiden Helices gebildete Pore eine hohe Permeabilität für Protonen und Kationen (insbes. K^+) (Übersicht: Gale et al., 1981).

Als Puffersystem wurde ein 10 mM Na-Phosphat- 10 mM Glycinpuffer mit 150 mM KCl (KPG-Puffer) verwendet. Die hohe Kaliumkonzentration sollte einer möglichen Gegenregulation der Zelle über den Na^+-H^+ -Austauschmechanismus erschweren und einen raschen Angleich durch die Gramicidinporen bewirken. Wegen der niedrigen Wasserlöslichkeit und der damit verbundenen Tendenz im wässrigen System inaktive Aggregate zu bilden, war es notwendig, relativ hohe Gramicidinkonzentrationen zu verwenden, um eine genügende Einlagerung in die Zellmembranen zu erreichen. Gramicidin D bewirkte bei einer Konzentration von 40 - 80 $\mu\text{g/ml}$ einen Angleich des pH_i an das Außen-pH im Bereich pH 6 bis 8 schon nach 20 bis 40 Minuten. Als Inkubationstemperatur wurden 21 °C RT gewählt, da bei niedrigeren Temperaturen die Zellen ihr pH_i nicht dem Außenmilieu angleichen und bei höheren Temperaturen DCH aus den Zellen diffundierte, sodaß die Fluoreszenzintensität für eine Messung im Durchflußzytometer zu schwach war. Für die Messungen wurden 2×10^7 R3230AC-Kulturzellen/ml mit 20 $\mu\text{g/ml}$ ADB in TBS pH 7 inkubiert, damit sie DCH anreichern. Nach 8 Minuten wurden davon 40 μl in 2 ml KPG-Puffer pH 4,7 und pH 8,5 mit ADB (20 $\mu\text{g/ml}$) allein oder zusätzlich mit Gramicidin D (40 $\mu\text{g/ml}$) gegeben und 250 μl -Aliquots nach 0 bis 40 Minuten (RT) im Durchflußzytometer gemessen (Abb. 17). Das pH_i erreichte in Gegenwart von Gramicidin nach 10 bis 20 Min. einen Wert, der in etwa dem Außen-pH entsprach (Abb. 17a). Die Zellen schwollen dabei bei pH 4,7 um den Faktor 1,3 und bei pH 8,5 um den Faktor 1,15 stärker an als ohne Gramicidin (Abb. 17b).

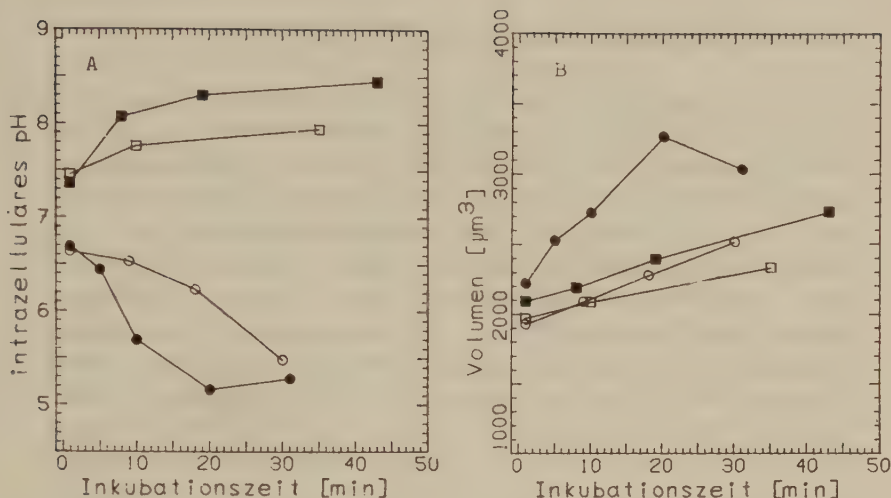


Abb. 17: pH-Angleich von R3230AC-Kulturzellen mit und ohne 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gramicidin D in KPG pH 4,7 und pH 8.5. Intrazelluläres pH (A), Zellvolumen (B), mit Gramicidin D bei pH 4.75 (●), ohne Gramicidin D bei pH 4.75 (○), mit Gramicidin D bei pH 8.5 (■), ohne Gramicidin D bei pH 8.5 (□).

Die Zeit, die für die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen pH_i und dem externen pH benötigt wurde, war für die einzelnen Zellarten unterschiedlich, sie betrug bei MNL 40 Minuten. Die Zeiten variierten auch in Abhängigkeit von einem sauren oder basischen Außenmilieu. So glichen die Zellen ihr pH_i einem externen pH oberhalb pH 7,5 rascher an als darunter.

Insgesamt verbesserten die Gramicidinversuche den pH-Angleich lebender Zellen. Allerdings war die Variabilität des pH_i -Angleichs bei verschiedenen Zelltypen und im Tag zu Tag Verlauf unbefriedigend, weshalb im folgenden der Energiestoffwechsel der Zellen mit Na-Azid vergiftet wurde.

3.3.4.3 pH-Angleich mit Gramicidin D und Na-Azid

Bei frisch gewonnenem Zellmaterial wurde auch in Gegenwart hoher Gramicidinkonzentrationen häufig beobachtet, daß in Puffern unter pH 6,5 sich das pH_i dem extrazellulären pH nicht anlich. Dieser Effekt war nicht von der extrazellulären K^+ - bzw. Na^+ -Konzentration abhängig; er trat sowohl in Puffersystemen mit 150 mM K^+ als auch 150 mM Na^+ auf. Eine Ursache dafür könnte ein aktiver zellulärer Regulationsmechanismus sein. Es wurde daher versucht, den Energiestoffwechsel der Zelle durch Zugabe von Na-Azid, einem Inhibitor der Cytochrom-c-oxidase, zu hemmen.

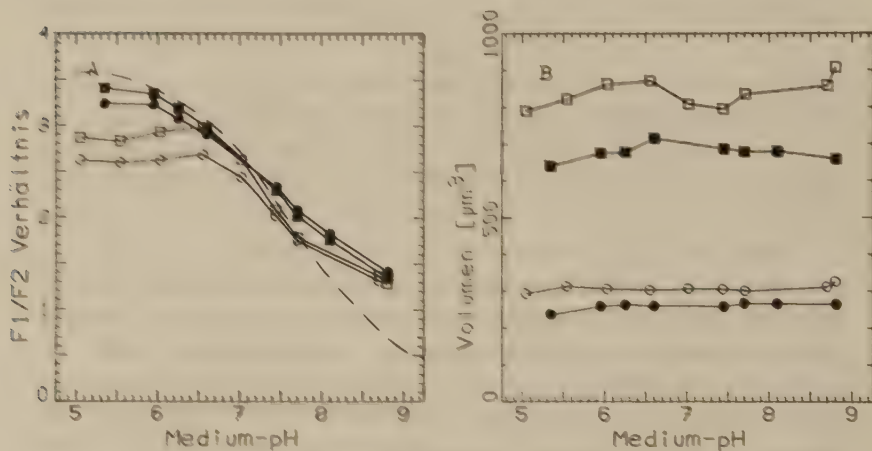


Abb. 18: F1/F2 Verhältnis (A) und mittleres Zellvolumen (B) bei einer intrazellulären pH-Eichung residenter Peritonealzellen mit 40 $\mu g/ml$ Gramicidin D bzw. zusätzlich 20 mM Azid. Die Zellen wurden in KPG pH 5 - 9 mit 20 $\mu g/ml$ ADB 20 Min. bei RT inkubiert. Granulocyten mit Gramicidin (○), mit Gramicidin und Azid (●), Makrophagen mit Gramicidin (□), mit Gramicidin und Azid (■).

In Abb. 18 wird das Ergebnis einer Eichung residenter Meer-schweinchenperitonealzellen mit Gramacidin D (40 $\mu\text{g/ml}$) einer mit Gramacidin D und Na-Azid (20 mM) gegenübergestellt: Es wurden 250 μl Zellen ($1 \times 10^7/\text{ml}$) mit 5 μl ADB (1 mg/ml in DMF) 5 Minuten lang bei RT inkubiert, um sie mit DCH zu "laden". 10 μl -Aliquots der DCH-gefärbten Zellen wurden mit 500 μl KPG-Puffer pH 5-9 vermischt, dem 10 μl ADB (1 mg/ml in DMF), 5 μl Gramacidin D (4 mg/ml in DMSO) und 0 bzw. 10 μl Na-Azid (1 M in H_2O) zugesetzt waren. Nach 20minütiger Inkubation bei RT wurden jeweils 250 μl für die pH-Messung im Durchflußzytometer verwendet. Mit einer pH-Elektrode (Typ CMAWL/4/5, Russel, Helmstadt-Bargen) wurde jeweils der Puffer-pH-Wert des Meßansatzes kontrolliert (Labor-pH-Meter, Knick, Berlin).

Während im Säuren mit Gramacidin allein die Zellen ihr pH_i nicht veränderten, glichen sie mit Azid ihr pH_i dem Außen-pH-Wert ohne eine Änderung des Zellvolumens (Abb. 18b) gut an. Auch verschwand die zwischen den beiden Zellarten bestehende pH-Differenz. Allerdings war, wie bei Gramacidin D allein, der Angleich oberhalb pH 8 nicht vollständig, was nicht erklärt werden konnte. Für die praktische Messung dürfte dieser Effekt ohne Bedeutung sein, da in den meisten Zellen so hohe pH-Werte unter natürlichen Umständen nicht auftreten. Der Zusatz von Azid beeinflusste die intrazelluläre Farbstoffkonzentration, die zwischen pH 5 und 8 wesentlich (20 - 40 %) erniedrigt war.

Das Gramacidin D/Azidverfahren für die pH-Eichung lebender Zellen ergibt Eichkurven, die sehr ähnlich der DCH-Eichkurve in Lösung sind (Abb. 18 bzw. 11b). Dies bestätigt die schon bei der DCH-Bindung an tote Zellen gemachte Vermutung, daß die einfache DCH-Gerätegleichlicht-Eichkurve für die intrazelluläre pH-Eichung verwendet werden kann, was in der Praxis eine erhebliche Erleichterung der intrazellulären pH-Messung mit Hilfe der Durchflußzytometrie darstellt und eine Langzeiteichung des Meßinstruments erlaubt.

3.3.4.4 Intrazelluläre pH-Werte verschiedener Zelltypen

Für die Eichversuche wurden verschiedene Zellarten, wie natürlich vorkommende Einzelzellen (MNL, Granulozyten und Makrophagen), Gewebszellen (Leberzellen) und in vitro kultivierte Zellen (Tumor R3230AC) verwendet. In Tabelle 4 sind über die zelluläre Eichung ermittelte absolute pH_i -Werte verschiedener Zellarten zusammengestellt.

Tabelle 4: Mit DCH bestimmte intrazelluläre pH-Werte

Zellen	pH_i	n ¹⁾
periphere Monozyten ²⁾	$7,14 \pm 0,07^6)$	5
periphere Lymphozyten ²⁾	$7,01 \pm 0,06$	5
periphere Granulozyten ²⁾	$6,79 \pm 0,04$	3
Makrophagen (resid.) ³⁾	$7,19 \pm 0,06$	3
große Makrophagen (stimul.) ³⁾	$7,12 \pm 0,04$	7
Granulozyten ³⁾	$7,18 \pm 0,03$	3
R3230AC ⁴⁾	$6,85 \pm 0,09$	6
Leberzellen ⁵⁾	$6,69 \pm 0,01$	3

Anmerkungen: 1) Zahl der Individuen, 2) Mensch, 3) Peritonealzellen Meerschweinchen, 4) Kulturzellen, 5) Wistar-Ratte, 6) mittlerer Fehler vom Mittelwert.

3.3.4.5 Regulationsfähigkeit von Zellen bei Änderungen des extrazellulären pH-Wertes

Bei Versuchen mit frisch gewonnenen Zellen wurde häufig beobachtet, daß Zellen ihr pH_i an das externe Milieu nicht angleichen. Diese Fähigkeit zur Gegenregulation wurde weiter charakterisiert. So wurden Zellen bei pH 5 und 6 nicht saurer, sondern wurden sogar über einen Zeitraum von 10 - 40 Minuten in einer überschießenden Reaktion um 0,2 bis 0,6 pH-Einheit alkalischer. Überraschend war, daß Gramicidin D diesen Effekt noch verstärkte. Auch änderten die gegen-regulierenden Zellen ihr Zellvolumen kaum.

In einem Versuch mit frisch trypsinisierten R3230AC-Kulturzellen wurden die Zellen zunächst in einer Konzentration von $2 \times 10^7/\text{ml}$ in TBS mit ADB (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei RT vorinkubiert, um sie mit DCH zu laden. Nach 10 Minuten wurden davon 40 μl in 2 ml KPG-Puffer pH 5 mit ADB (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) allein oder zusätzlich mit Gramicidin D (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei RT inkubiert und nach 1 bis 40 Minuten im Durchflußzytometer gemessen (Abb. 19). Ohne Gramicidin D wurden die Zellen nach 20 Minuten um etwa 0,6 pH-Einheiten alkalischer. Die Zellen schwollen dabei um das 1,2fache an. In einem anderen Ansatz mit R3230AC-Kulturzellen, die nach der Ablösung mit Trypsin 3 Tage bei 4 °C gehalten wurden, glichen die Zellen mit Gramicidin D, verbunden mit einer Volumenzunahme um das 1,6fache, gut an.

Der Befund, daß dieser Effekt nur bei Zellen auftrat, die frisch gewonnen wurden bzw. nicht längere Zeit bei RT gehalten worden waren, ließ den Schluß zu, daß ein aktiver Regulationsmechanismus eine Rolle spielen könnte. Dies wurde dadurch unterstützt, daß der Zusatz von 20 mM Na-Azid schon nach weniger als 5 Minuten die Gegenregulation hemmte. Die Gegenregulation ist offenbar ein Prozess, wozu nur Zellen mit einer hohen "Energieladung" in der Lage sind. Diese Fähigkeit wurde bei allen untersuchten Zellarten beobachtet.

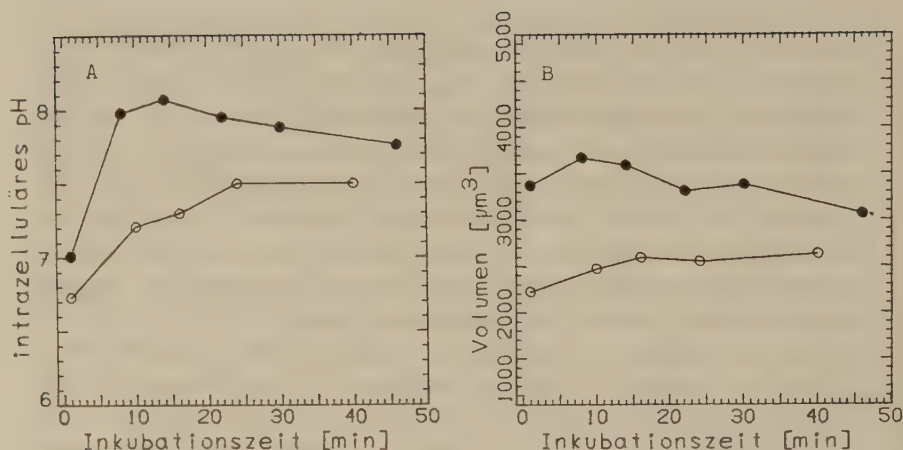


Abb. 19: Änderungen von pH (A) und Volumen (B) von R3230AC Kulturzellen. Unmittelbar nach dem Ernten wurden die Zellen mit ADB (20 µg/ml) 10 Minuten gefärbt und dann in KPG pH 5 mit (●) bzw. ohne (○) 40 µg/ml Gramicidin D inkubiert.

Die besonders ausgeprägte Gegenregulationsfähigkeit des Tumors R3230AC, die von dem Zustand der Kultur und dem schonenden Ernten der Zellen abhängig war, war allerdings kein Kriterium für den Erfolg einer Weiterkultur der Zellen, d.h. auch angleichende Zellen, die ein bis zwei Tage bei 4 °C aufbewahrt wurden, konnten weiter proliferieren. Sie lieferte somit nur einen Hinweis auf die "Energieladung" bzw. den aktuellen Funktionszustand der Zellen.

Es konnte nicht geklärt werden, auf welchem Mechanismus die Gegenregulation der Zellen im Säuren bei pH 5 und 6 beruht. Wären die Protonen gemäß einer Donnan-Verteilung im

Gleichgewicht über die Membran verteilt ($H_i/H_o = K_i/K_o$), müßten die Zellen z.B. bei einem Außen-pH von 7,4 und einem Membranpotential von -55 mV nach der Nernst-Gleichung ein pH_i von 6,05 haben (Roos & Boron, 1981). Die Zelle ist offenbar in der Lage, sowohl passiv einströmende, als auch durch den Stoffwechsel, wie z.B. der ATP-Hydrolyse freigesetzte Protonen auszuschleusen. Die Mechanismen sind komplex. Sie umfassen die zellinterne Pufferkapazität, die Umwandlung von Säure in neutrale Produkte (Lactat $\rightarrow$ Glucose), die Phosphocreatinspaltung und die Freisetzung von CO_2 . Der elektroneutrale H^+-Na^+ - und der ATP-abhängige Bicarbonat/Chlorid-Austausch spielen für die langfristige pH-Regulation eine wichtige Rolle.

Dieses Vermögen von Zellen, bei einem sauren Außenmilieu um pH 5 ein pH_i von 6,8 bis 7,2 über längere Zeit stabil zu halten, bzw. sogar mit einer Alkalinisierung über das ursprüngliche pH_i hinaus zu reagieren, wurde noch nicht in der Literatur beschrieben. Es wird meist die Ansicht vertreten, daß bei tierischen Zellen eine lineare Abhängigkeit des pH_i mit dem Außen-pH besteht (wie z.B. Visser et al., 1979). Eine Gegenregulationsfähigkeit wurde bei Einzellern und Mikroorganismen wie Bäckerhefe (pH_i $7,10 \pm 0,05$ bei pH 5 bis 6,5, Gillies, 1982), Tetrahymena (pH_i $7,15 \pm 0,05$ bei pH 5.75 bis 7.4, Gillies & Deamer, 1979) und Escherichia coli (pH_i $7,6 \pm 0,2$ bei pH 5,5 bis 9, Slonczewski et al., 1981) beschrieben. Bei höheren Organismen wurde eine Gegenregulationsfähigkeit entweder verneint oder lediglich innerhalb enger Grenzen um das physiologische Zell-pH bei Blut-lymphozyten (pH_i $7,17 \pm 0,06$ bei pH 6,8 bis 7,4, Deutsch et al., 1982) und Ehrlich Aszites Zellen (pH_i 7,05 bei pH 6,8 bis 7,2, Gillies et al., 1982b) gefunden. Der beschriebene Befund, daß Ehrlich Aszites Zellen unter pH 6 um durchschnittlich 0,5 pH-Einheiten alkalischer als das jeweilige Außen-pH sind, und daß dieser pH-Unterschied durch anaeroben Schock (N_2 -Begasung) sofort reversibel aufgehoben werden konnte, unterstützen die eigenen Ergebnisse.

3.3.5 Schlußfolgerungen aus den Eichversuchen des intrazellulären pH-Wertes

1. Die spektralen Eigenschaften des Durchflußzytometers können durch Messung des Fluoreszenzlichtes von DCH Lösungen verschiedener pH-Werte (F1 und F2) ermittelt werden. Aus den gemessenen F1/F2 Verhältnissen bei DCH-Lösungen unterschiedlichen pH kann eine Eich-tabelle erstellt werden, die für das betreffende Durchflußzyto-meter typisch und für lange Zeit konstant ist.
2. Der Zusatz von Polykationen (Polylysin, Polyornithin, Protaminsulfat) und Polyanionen (Heparin) verändert die pH-abhängigen F1/F2-Verhältnisse von DCH in Lösung nicht.
3. Positiv geladene poröse Latex- oder Sepharosepartikel reichern DCH an, wobei auch bei partikelgebundenem DCH eine pH-Abhängigkeit der F1/F2 Verhältnisse besteht. Bei Kenntnis der Eichkurve kann der pH-Wert des Suspensionsmediums aus dem F1/F2 Verhältnis ermittelt werden. Die Eichkurve für partikelgebundenes DCH weist allerdings für gleiche pH-Werte niedrigere F1/F2-Verhältnisse auf als bei DCH in freier Lösung, d.h. es besteht ein Umgebungseinfluß einer hydrophoben Matrix auf die spektralen Eigenschaften von DCH.
4. Zellbruchstücke reichern DCH und ADB geringfügig an, Lipidtropfen werden nicht angefärbt.
5. Lebende Zellen gleichen ihr pH_i dem Außenmilieu nur unvollständig an. Mit Porenbildnern wie Gramacidin D gleichen die Zellen besser, aber nicht ausreichend bei pH 5 bis 6 an; ein Zusatz von Na-Azid bewirkt einen guten Angleich zwischen pH 5 bis 8. Die erhaltenen F1/F2-Verhältnisse entsprechen für gleiche pH-Werte den

durch Gleichlichtmessungen ermittelten Werten.

6. Aus diesen Befunden kann für eine praktische pH-Eichung von Durchflußzytometern bei Verwendung von ADB folgende Empfehlung gegeben werden:

- Erstellung einer Gleichlichtkurve mit DCH, um den gerätespezifischen Meßumfang festzulegen. Diese Kurve ist über viele Monate in engen Grenzen konstant, leicht reproduzierbar und wird in den Computerprogrammen zur pH-Berechnung verwendet.
- Von Zeit zu Zeit Erstellung einer pH-Eichkurve mit Zellen, die mit 20 µg/ml ADB, 40 µg/ml Gramicidin D und 20 mM Na-Azid 15 - 20 Minuten bei RT inkubiert wurden, zur Kontrolle, ob mit Zellen die DCH-Gleichlichtkurve erreicht wird.

3.4 Charakterisierung peritonealer Meerschweinchenmakrophagen

Die Makrophagen stellen im allgemeinen den größten Anteil freier Zellen in der Bauchhöhle dar. Daneben befinden sich noch Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und Mastzellen in unterschiedlichen Anteilen. Die Gesamtzahl der Zellen wie auch deren prozentuale Anteile können schwanken in Abhängigkeit vom Tierstamm, dem Gesundheitszustand, Alter und Geschlecht des Tieres und auch davon, ob es sich um residente oder nach Applikation verschiedener Stoffe (wie z.B. Paraffinöl, Proteosepepton) um induzierte bzw. aktivierte Makrophagen handelt (Daems, 1980). In Tabelle 5 sind die Populationsmuster residenter Peritonealzellen verschiedener Tierstämme dargestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Zellpopulationen in der unstimulierten Bauchhöhle (in % der gesamten Ausbeute)¹⁾

Zellart	Maus	Meerschweinchen	Ratte
residente Makrophagen	54 $\pm$ 9	74 $\pm$ 8	66 $\pm$ 3
Monozyten	9 $\pm$ 3	<1	6 $\pm$ 2
Lymphozyten	25 $\pm$ 8	1 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1
neutrophile Granuloz.	<1	<1	<1
eosinophile Granuloz.	4 $\pm$ 3	19 $\pm$ 10	20 $\pm$ 3
Mastzellen	6 $\pm$ 5	<1	5 $\pm$ 2

¹⁾ nach Daems, 1980

Auffallend ist bei Meerschweinchen und Ratte das starke Auftreten eosinophiler Granulozyten und der sehr geringe Anteil von Lymphozyten.

3.4.1 Charakterisierung residenter peritonealer Zellen

- Volumen, Esterasekonzentration und pH_i

Residente Peritonealzellen wurden in einer Anzahl von $1,5 - 1,9 \times 10^7$ Zellen/Meerschweinchen entnommen. Nach einer durchflußzytometrischen Messung ADB-gefärbter residenter Peritonealzellen können in einem Zweiparameterhistogramm (Volumen/F1) 5 Zellpopulationen unterschieden werden, nämlich 4 esterasepositive (I - IV) und eine -negative (V) (Abb. 20a).

Da die Population der esterasenegativen Zellen zahlreiche absterbende Zellen enthielt (über eine gleichzeitige Anfärbung mit Propidiumiodid nachgewiesen), wird auf sie im folgenden nicht weiter eingegangen. Nach der Berechnung des Coulter-Volumens der esterase-positiven Zellen wurden für die Populationen I, II, III+IV mittlere Volumina von etwa 170, 300, und $700 \mu\text{m}^3$ (Tabelle 7a) erhalten. Der Vergleich der morphologischen Auswertung von Zytozentrifugenpräparaten (Schermer, 1967) mit der Auswertung durchflußzytometrischer Messungen ergab, daß es sich bei der Population I um Lymphozyten, bei der Population II um Granulozyten und bei der Population III+IV um kleine und große Makrophagen handelt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich einer zytologischen mit einer durchflußzytometrischen Auswertung residenter Meerschweinchenperitonealmakrophagen.

Zytologie:	Lymphozyten	eosin. Granulozyten	Makrophagen
	3,6 %	19,5 %	76,9 %
Durchfluß- zytometrie:	Population I	Population II	Pop. III+IV
	4,5 %	26,5 %	69 %

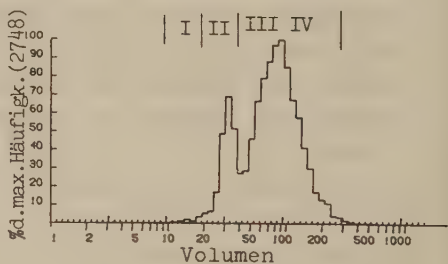
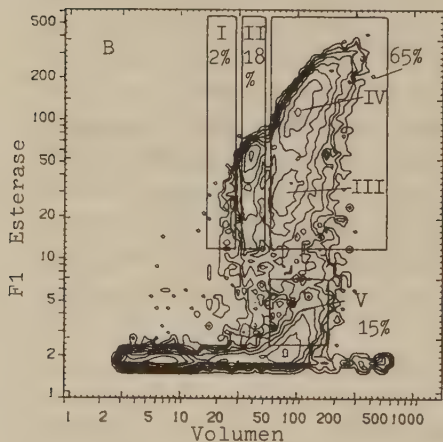
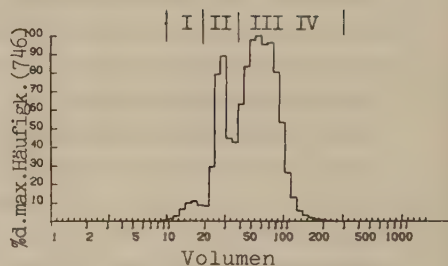
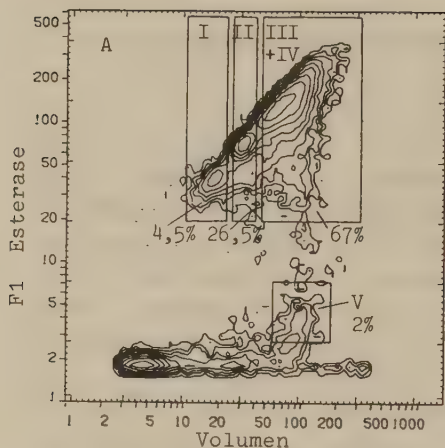


Abb. 20: ADB-Esteraseaktivität und Volumenprofil residenter Peritonealzellen in TBS pH 7,3 (A) und KPG pH 5,5 (B). Eine logarithmische Einheit auf der Zellvolumenachse entspricht $13 \mu\text{m}^3$.

Die gefundenen relativen Prozentanteile stimmten mit den entsprechenden Werten aus Tabelle 5 überein. Das Volumenhistogramm deutet eine Heterogenität der Makrophagen (Pop. III+IV) an. Dies wurde in einem Versuch bestätigt, wo Peritonealzellen 4 Stunden in KPG pH 5,5 bei RT inkubiert und 10 Minuten vor der Messung mit ADB (20 µg/ml) angefärbt wurden. Die Makrophagen spalteten in zwei diskrete Populationen mit unterschiedlicher Esteraseaktivität auf, wobei Population III (40 % der Makrophagen) eine Esterasekonzentration aufwies, die nur etwa halb so groß war wie die der Granulozyten (II) und der großen Makrophagen (IV) (Abb. 20b).

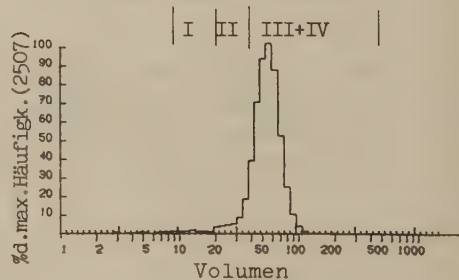
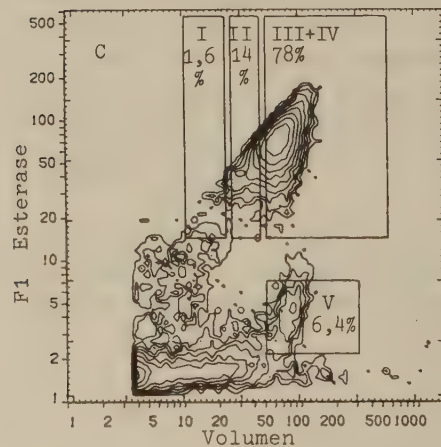
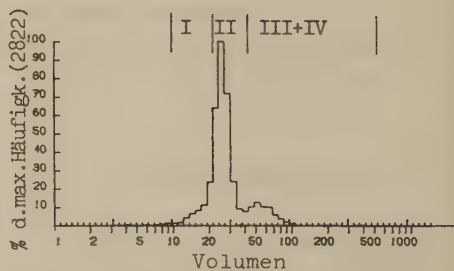
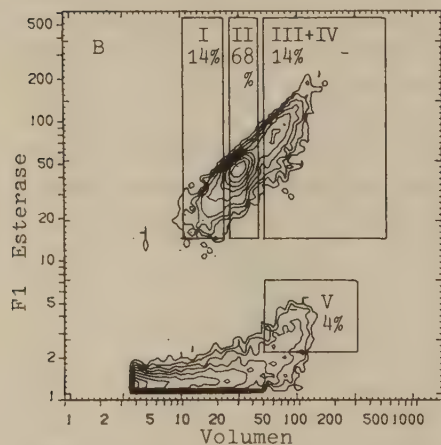
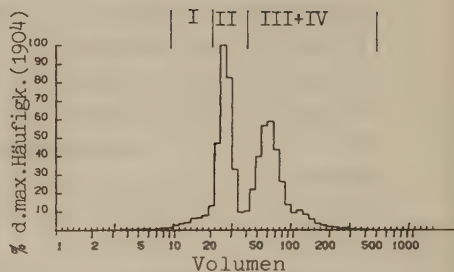
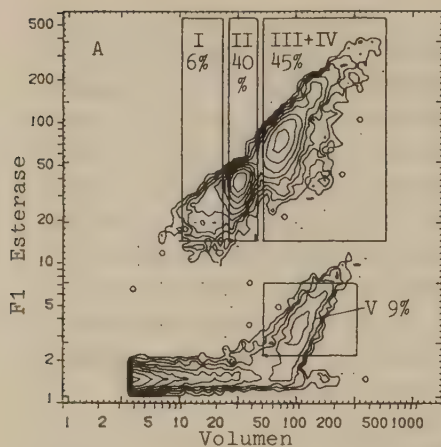
Lymphozyten besaßen im Vergleich zu allen Populationen die höchste Esterasekonzentration. Sie nahm bei den Makrophagen mit zunehmendem Zellvolumen ab und betrug etwa 70 % der Esterasekonzentration bei Lymphozyten.

Das intrazelluläre pH von Granulozyten und Makrophagen war 0,1 pH-Einheiten niedriger als von Lymphozyten (pH 7,28). Die Makrophagenpopulation V wies ein saures pH im Bereich pH 6,5 - 6,8 auf.

- Adhärenzfähigkeit

Makrophagen sind durch eine starke Adhärenzfähigkeit auf Glas- oder Plastikoberflächen gekennzeichnet. Die Ergebnisse eines Versuches mit residenten Zellen einer anderen Präparation zeigten, daß Makrophagen (III+IV), nicht aber Granulozyten (II) und Lymphozyten (I) adhärent sind

Abb. 21: ADB-Esteraseaktivität und Volumenprofile residenter Peritonealzellen nach der Präparation (A) und nach 2,5-stündiger Inkubation bei 37 °C (nicht adhärente Zellen (B), adhärente Zellen (C)). Eine₃ logarithmische Einheit auf der Volumenachse entspricht 13 µm³.



(Abb. 21). Dazu wurden 3×10^6 residente Peritonealzellen mit 2 ml RPMI1640 Medium in Plastikpetrischalen (für die Bakteriologie, Durchmesser 3,4 cm, Greiner, Nürtingen) im Brutschrank (37°C , 5 % CO_2) inkubiert. Die Einsaatdichte betrug 3×10^5 Zellen/ cm^2 . Nach 2,5 Std. wurden die Schalen leicht geschwenkt und die nicht adhärennten Zellen mit dem Kulturmedium abgenommen. Die adhärennten Zellen wurden mit einer Dispaselösung (Dispase II, 1,25 U/ml in TBS, Boehringer, Mannheim) 20 Min. im Brutschrank inkubiert und dann mit einem Gummispatel abgelöst.

- Phagozytosefähigkeit

Bestimmung des Anteils phagozytischer Zellen:

Zur Untersuchung der Phagozytose peritonealer Zellen mit einem Durchflußzytometer wurden die Zellen mit rhodamin-gefärbten, carboxylierten Latexpartikeln inkubiert. Rhodamin wurde als Fluoreszenzfarbstoff gewählt, um neben der Phagozytose gleichzeitig die ADB-Esterase-Aktivität zu messen. Zur Unterscheidung der Rhodamin- von der DCH-Fluoreszenz wurden bei einer geeigneten Lichtfilterkombination (Abb. 2b) phagozytierende Peritonealzellen ohne ADB-Zusatz bzw. nicht phagozytischer Peritonealzellen nach Färbung mit ADB im Durchflußzytometer gemessen.

In Abb. 22a ist das Fl/F2-Histogramm der 24 Stunden mit Partikeln inkubierten Zellen (wie in Kap. 2.10 beschrieben) und in Abb. 22b das der in einem Parallelansatz ebenso lange, aber ohne Partikel inkubierten und mit ADB angefärbten Zellen dargestellt. In den Histogrammen sind zusätzlich Flächen eingezeichnet, die die Rhodamin- von der DCH-Fluoreszenz abgrenzen. Das Ergebnis der gleichzeitigen Messung der Phagozytose- und Esteraseaktivität wird in Abb. 22c und d gezeigt. Die phagozytischen Zellen sind entsprechend ihrer Esteraseaktivität in Fl-Richtung verschoben und können von den nicht phagozytischen Zellen

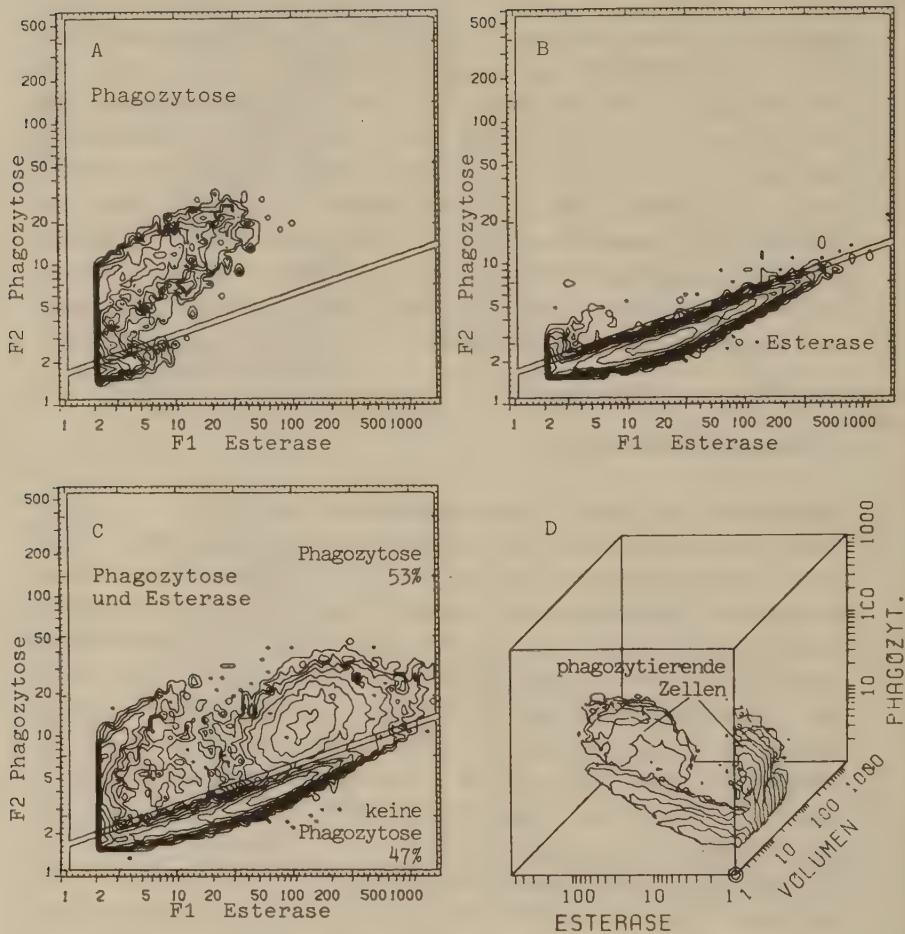


Abb. 22: Phagozytosefähigkeit und ADB-Esteraseaktivität residenter Peritonealzellen vom Meerschweinchen nach einer 24stündigen Inkubation bei 37 °C. F1/F2-Histogramme von Zellen, die mit Rhodamin-B gefärbten Latexpartikeln inkubiert wurden (A), nicht mit Partikeln inkubiert, aber vor der Messung mit ADB versetzt wurden (B) und von Zellen, die mit Partikeln inkubiert und vor der Messung mit ADB angefärbt wurden (C). 3-Parameterdarstellung (Volumen, Esterase, Phagozytose) der Teilabb. C (D). Eine logarithmische Einheit auf der Volumenachse entspricht 13 μm^3 .

unterschieden werden. Nach der oben gewählten Abgrenzung phagozytierten 53 % der Zellen (Abb. 22c). Es geht allerdings aus dieser Darstellung nicht hervor, wie sich dieser %-Satz auf die Granulozyten und Makrophagen verteilt. Zur Bestimmung der Phagozytose von Granulozyten mit hoher Esteraseaktivität wurde die Berechnung auf das Fenster "1" der Volumen/Esterasedarstellung (Abb. 23a, selbe Messung wie Abb. 22c,d) begrenzt.

Die quantitative Auswertung des F1/F2-Histogramms der von Fenster "1" umrahmten Zellen (Abb. 23b) ergab, daß nur 3 % dieser Zellen phagozytiert hatten. Aufgrund der analogen Berechnung für Makrophagen (Fenster "2", Abb. 23a) waren 93 % der Makrophagen phagozytotisch aktiv (Abb. 23c).

Der Anteil der phagozytierenden Zellen betrug nach 3stündiger Inkubation 89 % und erhöhte sich nicht während der nächsten 20 Stunden.

Bestimmung der Phagozytoseaktivität:

Zur Messung der Phagozytoseaktivität esterasepositiver Zellen als Maß der Konzentration gefressener Latexpartikel wurden die Meßwerte in Bezug auf den Fluoreszenzüberlapp von DCH in den F2-Kanal korrigiert. Die so ermittelten Werte ergaben, daß die wenigen phagozytierenden Zellen aus dem Granulozytenbereich eine um den Faktor 4 höhere Partikelmenge pro Zellvolumen aufgenommen hatte.

Intrazelluläres pH:

Es wurde das pH_i von Zellen, die mit bzw. ohne Latexpartikel inkubiert wurden miteinander verglichen. Die Granulozyten zeigten keine phagozytose-bedingten pH-Änderungen, das pH_i lag bei 7. Makrophagen waren etwa 0,2 pH-Einheiten alkalischer, wurden aber nach einer 3 bis 7-stündigen Inkubation mit Partikeln um diesen Betrag saurer. 24 Stunden nach Inkubationsbeginn war das pH_i bei allen Zellarten unabhängig von der Inkubationsbedingung saurer, es betrug etwa pH 6,8.

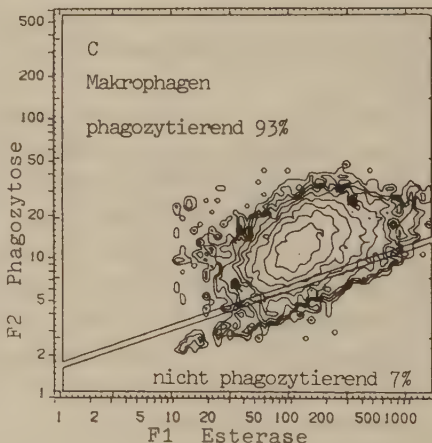
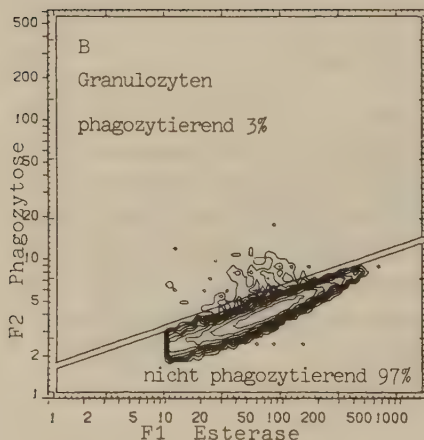
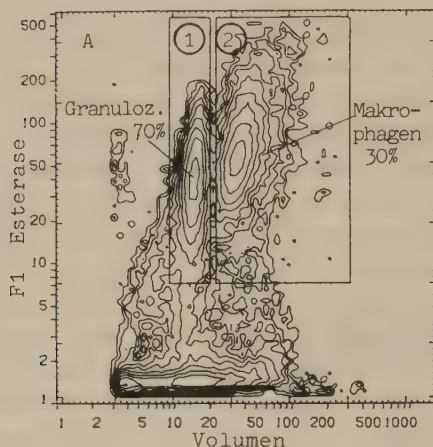


Abb. 23: Bestimmung der Esteraseaktivität (A) und der Phagozytose von Granulozyten (B) und Makrophagen (C) einer Präparation residenter Peritonealzellen. Abb. B wurde aus den Meßdaten dadurch berechnet, daß nur die Esterase und Phagozytosefähigkeit der im Volumenfenster ① der Abb. A enthaltenen Granulozyten verwendet wurden. Für Abb. C wurden nur die Daten des Volumensbereichs ② von Abb. A berücksichtigt. Der Strom für die Volumenmessung betrug statt 0,22 mA 0,145 mA. Die Fluoreszenzmessung und die Inkubationsbedingungen sind identisch mit der von Abb. 22c.

3.4.2 Charakterisierung paraffinölinduzierter Exsudatzellen

- Volumen, Esterasekonzentration und pH_i

Paraffinölinduzierte Peritonealzellen unterschieden sich in der Zahl ($1,7 - 4,8 \times 10^8$ /Tier) und Zusammensetzung erheblich von residenten Zellen. Außerdem zeichneten sie sich durch eine große Variabilität aus (Abb. 24).

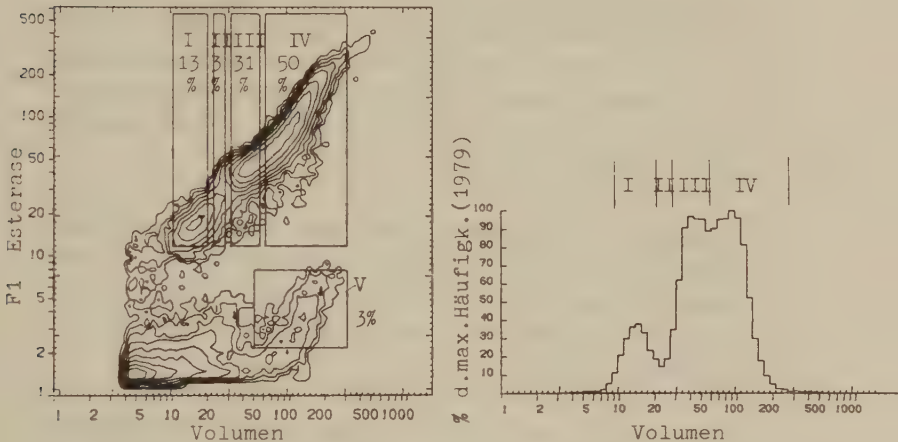


Abb. 24: ADB-Esteraseaktivität (A) und Volumenprofil (B) paraffinölinduzierter Peritonealexsudatzellen (7 Tage). I = Lymphozyten, II = Granulozyten, III = kleine Makrophagen, IV = große Makrophagen. Eine₃ logarithmische Einheit auf der Volumenachse entspricht $13 \mu\text{m}$.

Die Ergebnisse lassen sich so zusammenfassen (s. Tab. 7b):

- Die Gesamtzahl der Peritonealzellen nahm mit längerer Stimulationsdauer um das 10- bis mehr als 25fache zu.

- Nach etwa 5-tägiger Stimulation betrug der Makrophagenanteil etwa 80 - 95 %. Die restlichen Zellen waren Lymphozyten und neutrophile Granulozyten. Nach einer Stimulation mit Paraffinöl wanderten zunächst neutrophile Granulozyten ein, die die vorhandenen eosinophilen verdrängten. Am vierten Tag betrug der Anteil der Granulozyten nur mehr 1 bis 11 %. Dagegen stellten kleine Makrophagen (III), bei denen es sich wahrscheinlich um frisch eingewanderte Monozyten handelt, mit etwa 60 % den größten Anteil. Gleichzeitig traten große Makrophagen (IV) (um den Faktor 1,6 größer als residente Makrophagen) auf, deren Zahl sich im Verhältnis zu den Monozyten auf das etwa 3fache erhöhte. Ebenfalls nahm der Anteil der Lymphozyten von 5 % auf 10 bis 15 % zu. 3,5 % (V) hatten niedrige Esteraseaktivität.

- Die großen Makrophagen (IV) waren gegenüber den Lymphozyten (I) und kleinen Makrophagen (III) um etwa 0,1 pH-Einheiten saurer und unterschieden sich im pH_i nicht von Makrophagen und Granulozyten residenter Peritonealzellen.

- Wie bei den residenten Zellen besaßen die Lymphozyten die höchste Esterasekonzentration. Die Esterasekonzentration der großen Makrophagen war im Vergleich dazu um etwa 25 % erniedrigt.

Tabelle 7: Mittleres Volumen, relative Esterasekonzentration und intrazelluläre pH-Werte von Meerschweinchen-peritonealzellen.

A) residente Zellen:

Zellart	Volumen (μm^3)	relative Esterasekonz.	pH _i	n ²⁾
Lymphozyten (I)	170 $\pm$ 18 ¹⁾	0,69 $\pm$ 0,1	7,28 $\pm$ 0,04	(3)
eosinoph. Granulozyten (II)	305 $\pm$ 18	0,58 $\pm$ 0,08	7,16 $\pm$ 0,01	(3)
Makroph. (III+IV)	735 $\pm$ 89	0,47 $\pm$ 0,06	7,19 $\pm$ 0,06	(3)

B) Paraffinöl induzierte Zellen:

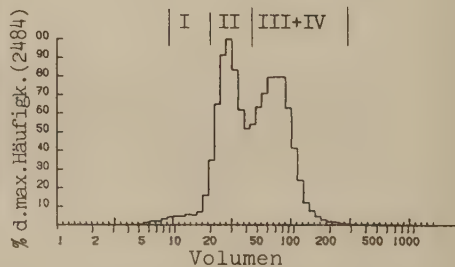
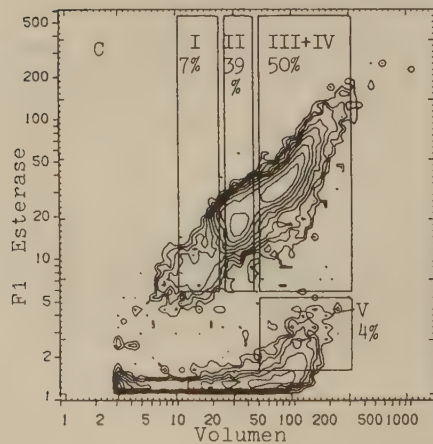
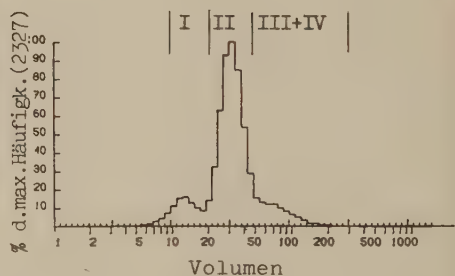
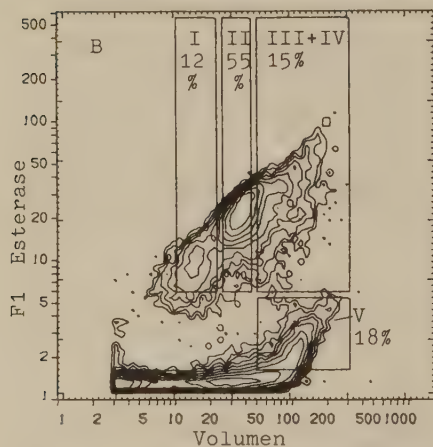
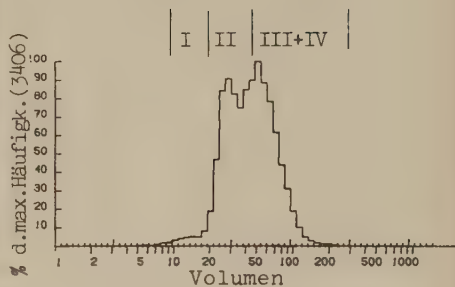
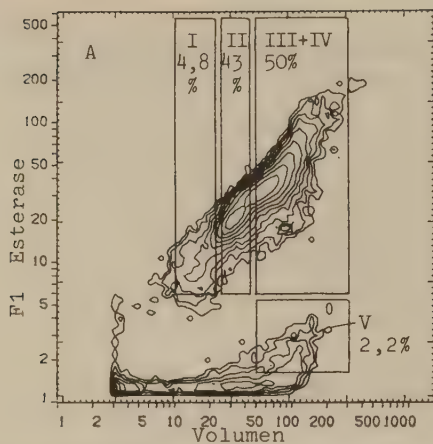
Lymphozyten (I)	164 $\pm$ 11	0,56 $\pm$ 0,04	7,24 $\pm$ 0,04	(8)
kl.Makroph. (III)	418 $\pm$ 21	0,52 $\pm$ 0,04	7,27 $\pm$ 0,05	(7)
gr.Makroph. (IV)	1202 $\pm$ 81	0,38 $\pm$ 0,04	7,12 $\pm$ 0,04	(7)

Anm.: ¹⁾ mittlerer Fehler vom Mittelwert, ²⁾ Zahl der untersuchten Tiere.

- Auftrennung ölunduzierter Peritonealzellen über einen Ficoll-Gradienten

Paraffinölunduzierte Exsudatzellen (3 Tage induziert) wurden durch eine Ficollzentrifugation aufgetrennt und die in der Interphase zwischen Ficoll und Medium bzw. die am Boden des Stufengradienten befindlichen Zellen nach der Anfärbung mit ADB im Durchflußzytometer gemessen (Abb. 25). Im einzelnen

Abb. 25: ADB-Esterasemuster und Volumenverteilung paraffin-ölunduzierter (2 Tage) Peritonealexsudatzellen ohne Auftrennung (A) und nach Auftrennung durch einen Ficollstufengradienten (Interphase (B), Boden (C)). Eine₃ logarithmische Einheit auf der Volumenachse entspricht 13 μm^3 .

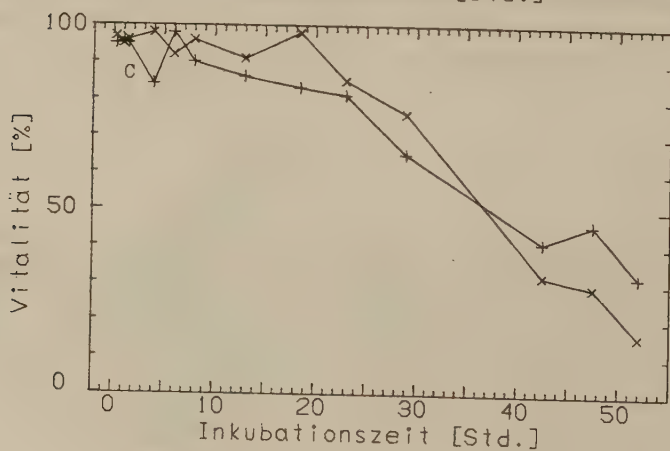
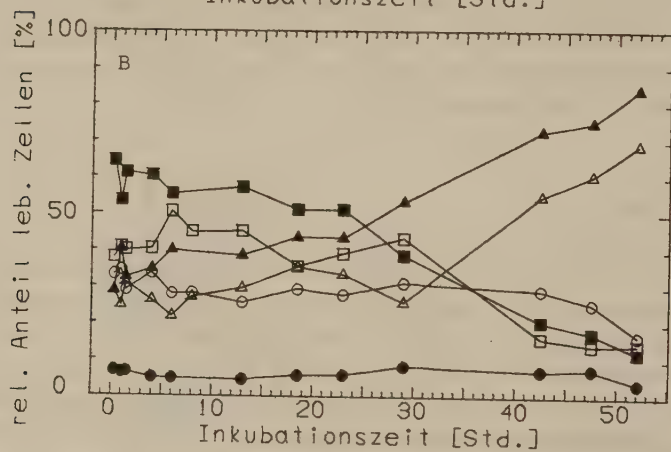
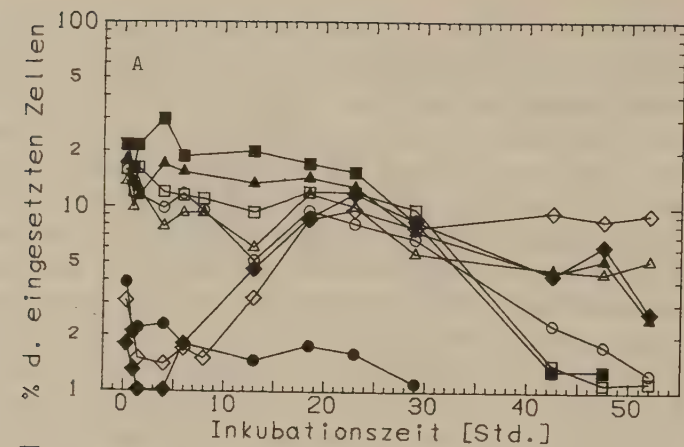


wurden dazu 3 ml MSL-Lymphozytentrennmedium (Dichte 1,077, Mediapharm, Aschaffenburg) mit 4 ml ölinduzierten Peritonealzellen ($1,9 \times 10^7$ Zellen in RPMI1640 Medium) überschichtet und zentrifugiert (30 Min., $400 \times g$, $20^\circ C$). Auf dem Boden des Dichtegradienten wurden überwiegend (55 %) Zellen mit einem mittleren Volumen von $350 \mu m^3$ gefunden (Abb. 25b), die nach ihrem Sedimentationsverhalten und nach der morphologischen Untersuchung des Zytozentrifugenpräparates als Granulozyten identifiziert wurden (76 % neutrophile, 4,4 % eosinophile Granulozyten). Die Zellen aus der Interphase des Ficoll-Stufengradienten bestanden hauptsächlich aus Makrophagen (III+IV) (50 %, Abb. 25c); sie enthielten jedoch noch Granulozyten (39 %), was im gefärbten Zytozentrifugenpräparat morphologisch bestätigt wurde (23 % neutrophile Granulozyten).

- Adhärenz

Die einzelnen Zellarten paraffinölinduzierter Peritonealzellen wurden sowohl auf ihre Adhärenzfähigkeit als auch auf Änderungen ihres pH_i , des Zellvolumens und der Esterasekonzentration während einer in vitro Inkubation untersucht. Für die Inkubation wurde, wie in Material und Methoden (Kap. 2.10) beschrieben, dem Kulturmedium kein Serum zugesetzt, um eine mögliche Beeinflussung der Makrophagen durch Serumfaktoren auszuschließen.

Abb. 26: Eigenschaften adhärenter und nicht adhärenter paraffinölinduzierter (7 Tage) Peritonealzellen während einer 52-stündigen Inkubation. Lymphozyten adhärent (●), nicht adhärent (○); Makrophagen (III) adhärent (■), nicht adhärent (□); Makrophagen (IV) adhärent (▲), nicht adhärent (△); Makrophagen (V) adhärent (◆), nicht adhärent (◇); gesamte adhärente Zellen (x), gesamte nicht adhärente Zellen (+).



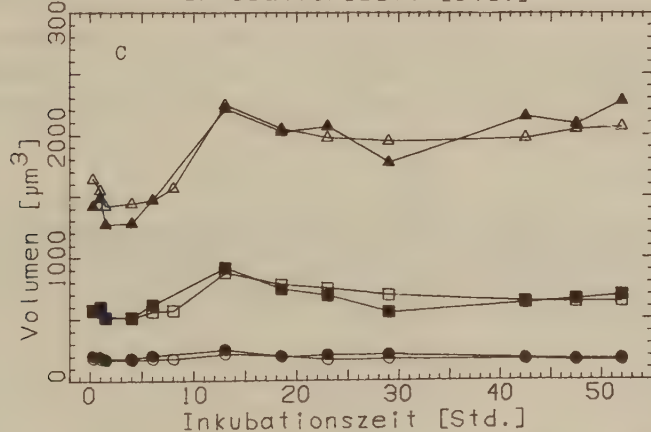
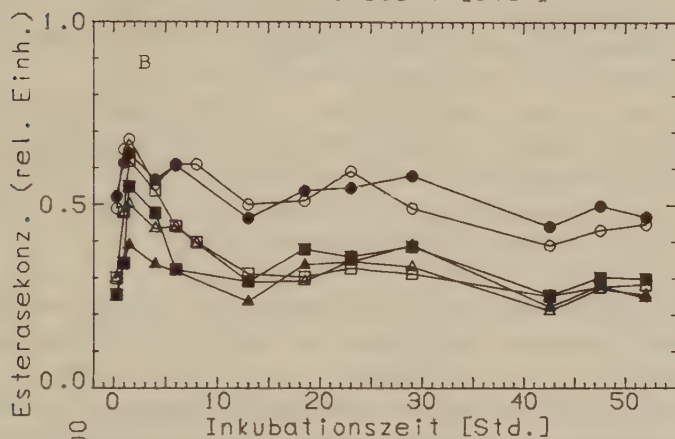
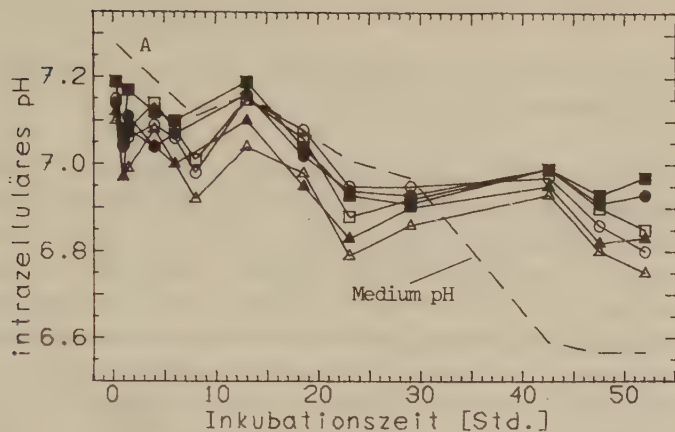


Abb. 27: Eigenschaften adhärenter und nicht adhärenter paraffinölinduzierter (7 Tage) Peritonealzellen während einer 52-stündigen Inkubation. Symbolerklärung Abb. 26.

Die Ergebnisse während einer 53stündigen Inkubation lassen sich so zusammenfassen:

- Adhärenzverhalten: Die Makrophagen adhärirten nicht vollständig auf hydrophoben Plastikoberflächen. 40 bis 50 % sowohl der kleinen (III) als auch der großen Zellen (IV) waren nicht adhärent. Während der Inkubation blieb das Verhältnis der Zellzahl in der adhärennten und nicht adhärennten Fraktion unverändert. Mit einer zu hohen Einsaatdichte konnte die nur partielle Adhärenzfähigkeit der Makrophagen nicht erklärt werden. Sie betrug $3 - 4 \times 10^5/\text{cm}^2$; in der Literatur wurden Einsaatdichten von $5 - 6 \times 10^5/\text{cm}^2$ beschrieben (Klimetzek & Remold, 1980).

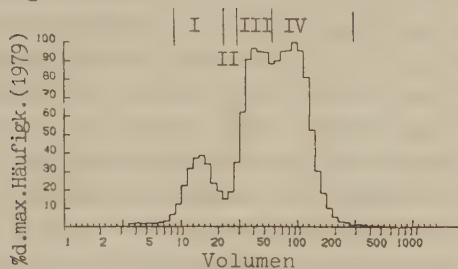
Adhärennte und nicht adhärennte Zellen derselben Zellart unterschieden sich nicht im mittleren Zellvolumen, pH_i und Esteraseaktivität voneinander.

Lymphozyten waren nicht adhärennt, sie wurden nur in der Überstandsfraktion gefunden.

- Zellzahl: Im Verlauf der 50-stündigen Inkubation ging die Gesamtzellzahl deutlich auf 22 % des Ausgangswertes zurück (Abb. 26a). Die Vitalität der Zellen war die ersten 20 Stunden unverändert bei 90 %, nahm dann aber stetig bis auf etwa 20 % ab (Abb. 26c). Die Zahl der esterasenegativen Makrophagen stieg nach 10 Stunden in der adhärennten und nicht adhärennten Fraktion an und erreichte nach 20 Std. ein Plateau bei

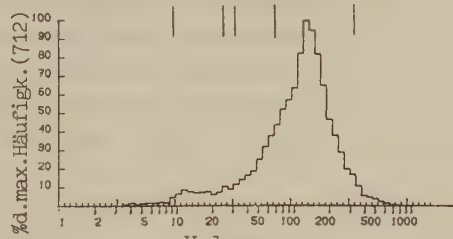
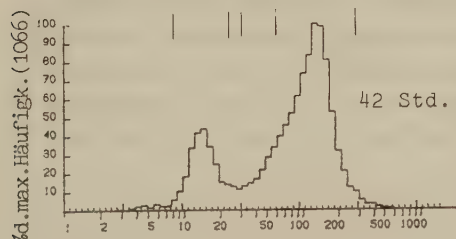
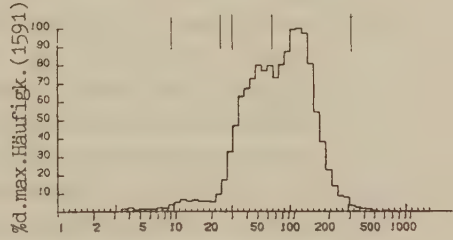
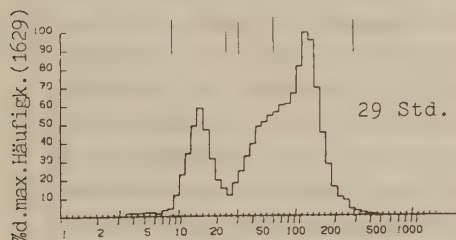
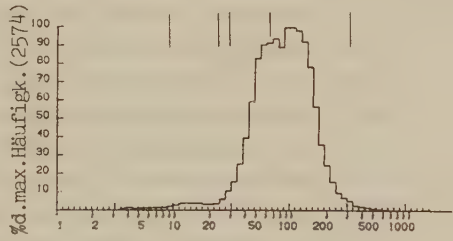
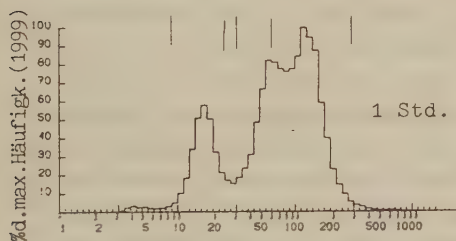
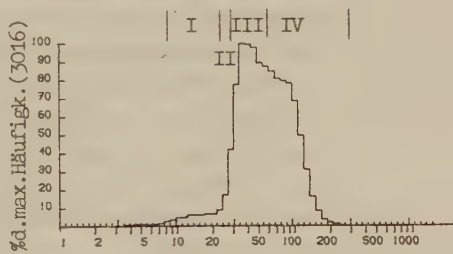
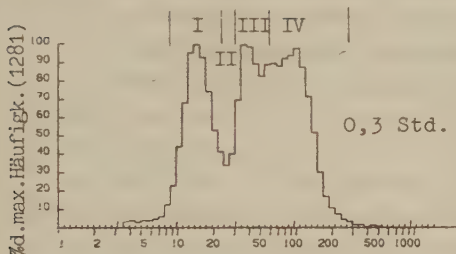
Abb. 28: Volumenhistogramme adhärennter und nicht adhärennter paraffinölinduzierter (7 Tage) Peritonealzellen während einer 52-stündigen Inkubation. Eine logarithmische Einheit auf der Volumenachse entspricht $13 \mu\text{m}^3$.

Originalzellen:



adhärente Zellen:

nicht adhärente Zellen:



10 %. Die Zahl der kleinen Makrophagen (III) nahm im Vergleich zu den großen (IV) stärker ab. Die Berechnung der relativen Anteile der Populationen ergab dagegen (Abb. 26b), daß während der Inkubation die Zellzahl der Population IV zunahm und die der Population III abnahm. Die Änderung des Populationsmusters beider Fraktionen ist anhand von Volumenprofilen in Abb. 28 dargestellt. Diese Beobachtung kann einerseits mit einer Umwandlung kleiner Makrophagen in große Makrophagen oder mit einer höheren Empfindlichkeit bzw. Sterblichkeit der kleinen Makrophagen begründet werden. Gegen die erste Erklärungsmöglichkeit spricht, daß die Zahl der großen Makrophagen (IV) während der Inkubation nicht über die Ausgangswerte ansteigt (Abb. 26a). Eine erhöhte Sterblichkeit der kleinen Makrophagen geht aus den Ergebnissen nicht hervor, da die Vitalität der einzelnen Populationen nicht bestimmt werden konnte. Somit war eine Erklärung dieser Beobachtung nicht möglich.

- Intrazelluläre pH-Werte: Die Zellen waren zu Beginn der Inkubation um etwa 0,2 pH-Einheiten saurer als das Kulturmedium. Im Lauf der 52-stündigen Inkubation nahm, wahrscheinlich bedingt durch Lactatfreisetzung, der pH-Wert des Kulturmediums um 0,75 pH-Einheiten von pH 7,3 auf pH 6,55 ab. Die lebenden Zellen wurden die ersten 30 Stunden um durchschnittlich 0,25 pH-Einheiten (von pH 7,15 auf pH 6,9) saurer, hielten dann aber bis zum Ende der Inkubation ihr pH_i konstant. Somit waren sie nach 52-stündiger Inkubation um 0,2 bis 0,4 pH-Einheiten alkalischer als das Kulturmedium. Dies ist wiederum ein Beispiel für die Gegenregulationsfähigkeit lebender Zellen, die auch nach Inkubation von Zellen in sauren Puffern (pH 5 bis 6) beobachtet wurde (s. Kap. 3.3.4.5).

- Esterasekonzentration: Sie stieg in den ersten 5 Inkubationsstunden um ca. 15 % an und kehrte dann zum Ausgangsniveau zurück (Abb. 27b). Die Lymphozyten zeigten zur gleichen Zeit verglichen mit den großen und kleinen Makrophagen stets eine um ca. 40 % höhere Esterasekonzentration.
- Volumen: Das mittlere Volumen der großen Makrophagen (IV) nahm um den Faktor 1,4 zu, das der kleinen Makrophagen (III) um den Faktor 1,2 und das der Lymphozyten (I) blieb nahezu unverändert (Abb. 27c).

3.5 Einfluß von Insulin auf den intrazellulären pH-Wert von Monozyten und Lymphozyten

Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung intrazellulärer pH-Messungen bei Normalpersonen und Diabetikern wurden Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes von menschlichen Monozyten nach Insulineinwirkung untersucht. Makrophagen können im menschlichen System wegen ihrer schwierigen Gewinnung nicht gut untersucht werden. Es wurde deshalb auf eine Makrophagenvorstufe, den relativ einfach aus peripherem Blut anzureichernden Monozyt zurückgegriffen.

Insulin ist ein Polypeptidhormon, das eine wichtige Rolle in der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels spielt. Insulinrezeptoren wurden neben den typischen Zielzellen für Insulin, den Leber-, Fett- und Muskelzellen, Monozyten und auf kultivierten Lymphozyten und Erythrozyten nachgewiesen (Kahn & Roth, 1976). Aus dem Vorhandensein dieser Rezeptoren wird im allgemeinen auf die Möglichkeit insulinspezifischer zellulärer Funktionsänderungen geschlossen. An Hepato- und Adipozyten wurde z.B. eine Stimulierung des Glucosetransportes, der Liponeogenese und der Glykogen- und Proteinsynthese

nach Insulingabe gezeigt (Häring et al., 1981). Damit kann erklärt werden, warum Insulin für Zellkulturen als Wachstumsfaktor benötigt wird. Über insulinabhängige Änderungen zellulärer Eigenschaften von Monozyten gibt es erst wenige Hinweise. Obwohl für Insulinbindungsstudien beim Menschen hauptsächlich Monozyten verwendet werden, wurden erst 1979 insulinspezifische Stoffwechseländerungen bei diesen Zellen nachgewiesen. Diese umfassen eine Stimulierung der Glucoseaufnahme und Lactatfreisetzung (Beck-Nielsen & Pedersen, 1979, Bieger et al., 1980) und eine Steigerung der antikörperabhängigen Zytotoxizität (ADCC) (Beck-Nielsen et al., 1982). Insulin erhöht auch die lysosomale Enzymaktivität von MNL (Henze & Chait, 1981). Das Ziel der folgenden Untersuchungen war zu klären, ob frischgewonnene, humane MNL auf Zusatz von Insulin mit einer Änderung des pH_i reagieren.

Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut über eine Ficoll-Zentrifugation isoliert (Kap. 2.13.1) und mit Insulin, Glucose, bzw. Insulin und Glucose wie in Abschnitt 2.21 beschrieben, inkubiert.

Bereits innerhalb von drei Minuten nach Zugabe von Insulin (30 mU/ml) in Gegenwart von Glucose (5 mM) wurden Monozyten und Lymphozyten um 0,15 bis 0,2 pH-Einheiten alkalischer und erreichten nach 20 Minuten wieder ihr ursprüngliches pH (Abb. 29a). Glucose allein (Abb. 29c) bewirkte eine Ansäuerung der Lymphozyten um 0,4 pH-Einheiten und der Monozyten um 0,8 pH-Einheiten. Mit Insulin allein (Abb. 29b) wurden die Monozyten nach 20 Minuten um 0,2 pH-Einheiten alkalischer, und die Zellen änderten im Kontrollversuch ohne jeden Zusatz (Abb. 29d) ihr pH im Versuchszeitraum nicht. Das Zellvolumen der Monozyten und Lymphozyten blieb bei allen Inkubationsbedingungen unverändert.

Die pH-Änderungen der Monozyten und Lymphozyten lassen sich aufgrund der erhaltenen Ergebnisse in zwei Reaktionsmechanismen aufgliedern: Die rasche, innerhalb weniger

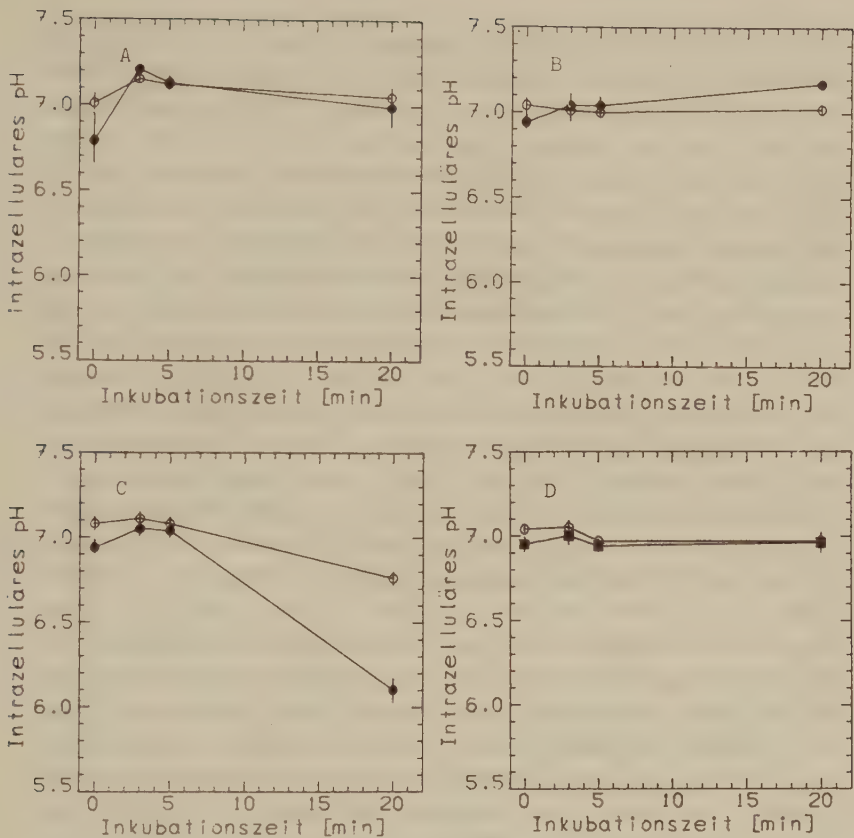


Abb. 29: Intrazelluläre pH-Werte von peripheren Humanlymphozyten (O) und -monozyten (●) nach Zusatz von 30 mU/ml Insulin und 5 mM Glucose (A), 30 mU/ml Insulin (B), 5 mM Glucose (C) und ohne Zusatz (D). Die eingespeicherten Meßpunkte sind Mittelwerte von 3 gesunden Personen (25 bis 35 Jahre). Eingezeichnete Balken sind die mittleren Fehler vom Mittelwert.

Minuten auftretende Alkalinisierung in Gegenwart von Glucose und Insulin läßt auf Änderungen von Ionenflüssen schließen. Die darauffolgende langsamere Ansäuerung bzw. die Ansäuerung der Monozyten in Gegenwart von Glucose allein ist eher durch den intrazellulären Stoffwechsel erklärbar. Insulin ist ein anabolisch wirksames Hormon, das eine Erhöhung des intrazellulären Substratangebotes und eine Steigerung von Enzymaktivitäten für die Energiespeicherung bewirkt. Die in den eigenen Versuchen beobachtete Hemmung der glucoseinduzierten Ansäuerung steht damit im Einklang. Im Gegensatz dazu fanden mehrere Autoren bei Muskelzellen und Monozyten eine insulinbedingte Stimulierung der Lactatfreisetzung (Beck-Nielsen und Pedersen, 1979, Bieger et al., 1980, Moore et al., 1979). Beck-Nielsen wies allerdings darauf hin, daß nur etwa 50 % der von Monozyten aufgenommenen Glucose in Lactat umgesetzt wurde. Er schloß daraus, daß Insulin auch andere intrazelluläre Stoffwechselwege aktivieren könnte.

Weitgehend unbekannt ist der molekulare Mechanismus der Insulinwirkung. Zyklisches AMP und GMP schieden als mögliche "second messenger" aus (Czech, 1977). Moore schlug vor, daß als "second messenger" kein synthetisierter stofflicher Faktor, sondern die intrazelluläre Protonenkonzentration wirksam sein könnte. Er stützte diese Behauptung damit, daß durch Insulinzusatz an Froschmuskelzellen in vitro nach einer 90minütigen Inkubation eine signifikante Erhöhung des pH_i auftrat (gemessen mit DMO, Moore et al., 1982). Moore entwickelte für die Insulinwirkung ein Modell, das "insulin transduction system". Danach sendet die Bindung von Insulin an seine Plasmamembranrezeptoren ein Signal aus, das sowohl den $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ -Austausch als auch die Na^+ -Pumpe stimuliert. Als Nettobilanz ergibt sich eine intrazelluläre Alkalinisierung. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bei Thrombin-induzierten pH_i -Änderungen von Blutplättchen nachgewiesen (Simons et al., 1982). Dort trat eine (mit 9-Aminoacridin bzw. 6-Carboxyfluoresceindiaceat gemessene) Alkalinisierung um

0,3 pH-Einheiten innerhalb von 60 - 90 Sekunden auf, ein Befund, der durch die eigenen Untersuchungen unterstützt wurde.

Interessant im Zusammenhang zur Diskussion der Bedeutung der Rezeptorenanzahl für die Stärke des Insulineffektes ist das Ergebnis, daß Monozyten und Lymphozyten im gleichen Maß auf Insulin reagierten. Es wurde zwar gezeigt, daß unter den MNL nur Monozyten und aktivierte Lymphozyten, nicht aber frisch gewonnene Lymphozyten Insulinrezeptoren besitzen (Schwartz et al., 1975), in neuerer Zeit erschienen allerdings Berichte, in denen parallele Änderungen der Insulinrezeptoren auf Monozyten und Lymphozyten bei Diabetikern bestimmt (Beck-Nielsen et al., 1982) und relative Insulinbindungsanteile an Monozyten und Lymphozyten beschrieben wurden (Giesen et al., 1983). Obwohl nach der letzten Studie der einzelne Monozyt im Durchschnitt 30mal mehr Insulin als der einzelne Lymphozyt bindet, war jeweils das Ausmaß der pH-Änderungen in den eigenen Versuchen bei beiden Zellarten ähnlich, d.h. Insulinrezeptorenzahl und funktionelle Reaktion der Zellen verhielten sich unterschiedlich. Bei Diabetikern des Typ I und II ergab sich in unseren Untersuchungen ein ähnliches Stoffwechselverhalten, so daß sich diese pH-Messung nicht in allgemeiner Weise zur Unterscheidung von Diabetikertypen und dem Bestehen eines Diabetes eignet. Geeignet ist sie dagegen, in heterogenen Zellsuspensionen insulinbedingte Stoffwechseländerungen auf schnelle Weise zu erfassen.

Nicht weiter untersucht wurde im Rahmen dieser Arbeit der molekulare Mechanismus und die Funktion der insulininduzierten Alkalinisierung von Humanlymphozyten und -monozyten. Eine langsame und stetige Alkalinisierung und die Notwendigkeit sehr hoher Insulinkonzentrationen (250 mU/ml) bei den Versuchen mit Froschmuskelzellen lassen bei jenen Zellen einen anderen Wirkungsmechanismus vermuten. Es ist schwierig zu beurteilen, inwieweit auch der bei MNL gefundene Effekt

physiologisch relevant ist, d.h. in welchem Maß von in vitro gewonnenen Erkenntnissen auf eine in vivo Funktion geschlossen werden darf, zumal auch hier wesentlich höhere Insulinkonzentrationen eingesetzt wurden, als im natürlichen System vorkommen (von 100 bis 300 $\mu\text{U/ml}$).

Zusammenfassend lassen die an Monozyten und Lymphozyten erhaltenen Ergebnisse erkennen, daß Zellen des Immunsystems unabhängig von ihrer Insulinrezeptordichte auf in vitro zugesetztes Insulin in Gegenwart von Glucose spezifisch mit einer raschen kurzzeitigen intrazellulären Alkalinisierung bis zu 0,2 pH-Einheiten reagieren.

3.6 Charakterisierung von Makrophagen mit monoklonalen Antikörpern

Makrophagen wurden durch den Besitz von Oberflächenmarkern wie Fc-, C3-Rezeptoren und phagozytenspezifische Antigene charakterisiert (McKeever & Spicer, 1980). Die Expression dieser Syntheseparameter ist von dem Reifungsgrad und Funktionszustand der Makrophagen abhängig. Zur Untersuchung makrophagenspezifischer Membranantigene mittels der indirekten Immunfluoreszenz wurden monoklonale Antikörper verwendet, die von U. Mauer (Mauer, 1983) und Prof. R. Burger (Inst. f. Med. Mikrobiologie, Univ. Mainz) gegen paraffinölstimulierte Meerschweinchenmakrophagen induziert worden waren (Kap. 2.12, Tabelle 1). Es war das Interesse der folgenden Untersuchung, mit diesen zur Verfügung gestellten Antikörpern den Grad der Expression makrophagenspezifischer Antigene vor und nach verschiedenen Stimulationen bzw. Aktivierungen auf Einzelzellebene zu bestimmen und somit zu prüfen, ob die antigenen Eigenschaften gleichmäßig auf alle Zellen verteilt sind, oder ob Subpopulationen existieren. Die Expression der von diesen Antikörpern spezifisch erkannten Membranoberflächenantigene an residenten, paraffinölinduzierten und mit LPS bzw. poly I:C in vitro aktivierten ölinduzierten Peritonealmakrophagen im Durchflußzytometer wurde mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz (s. Kap. 2.22) untersucht. In einer simultanen Dreiparametermessung wurden neben der Fluoreszenzintensität des sekundären Antikörpers und dem Zellvolumen der lebenden Zelle auch der DNS-Gehalt toter Zellen (Mithramycin-Färbung) bestimmt.

Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität allein erlaubt nicht, den Expressionsgrad von Membranantigenen verschieden großer Zellen in standardisierter Weise miteinander zu vergleichen. Erst durch die simultane Messung der Fluoreszenzintensität und des Zellvolumens auf Einzelzellebene wird die Berechnung der vergleichbaren Antigenpackungsdichten (Oberflächendichten) möglich. Die Oberfläche der Zelle wurde

aus dem Zellvolumen unter Annahme einer Kugelform berechnet. Für die Auswertung der Meßdaten wurde zwischen lebenden und Mithramycin-gefärbten toten Zellen unterschieden. So wurde von den lebenden Zellen der antigenexprimierende Anteil und von diesen antigenpositiven Zellen die mittlere Antigenpackungsdichte (Oberflächendichte) berechnet. Von den toten Zellen wurde die Zellzyklusphase und nach rechnerischer Elimination des Fluoreszenzüberlapps von Mithramycin in den Fl-Immunfluoreszenz Lichtkanal, die Antigenexpression auch auf diesen Zellen errechnet. In Abb. 30 und 31 wird anhand einer Messung paraffinölinduzierter Peritonealzellen mit Antikörper Nr. 4 die Auswertung veranschaulicht.

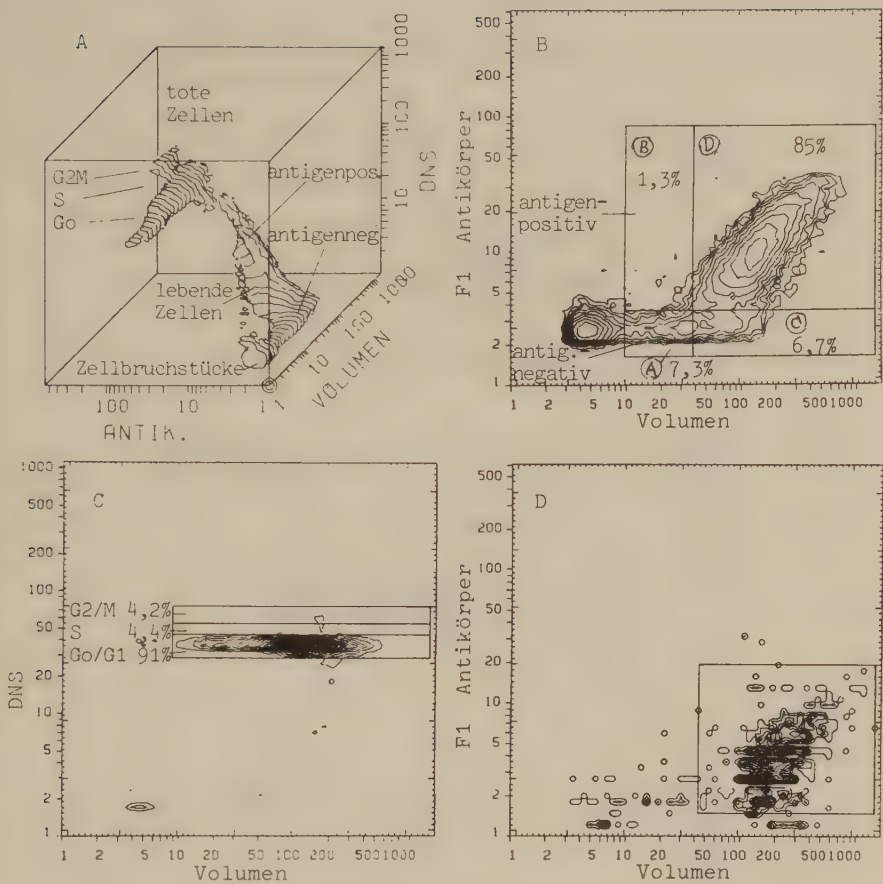
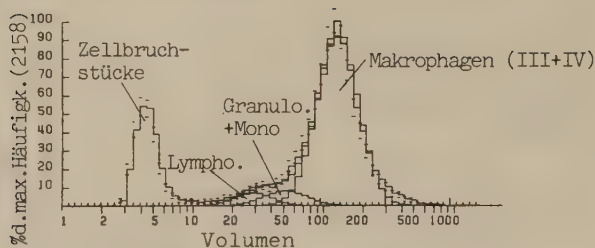


Abb. 30: Auswertung einer Dreiparametermessung (Zellvolumen, Bindung von Antikörper Nr. 4 und DNS (mit Mithramycin)) paraffinölinduzierter Peritonealzellen (A) durch Projektion der lebenden Zellen auf die Zellvolumen-FITC-Antikörperebene (B), der toten Zellen auf die Zellvolumen-DNS-Ebene (C). Die Darstellung des Zellvolumens gegen die Antigenpositivität der toten Zellen (D) wurde dadurch erhalten, daß der Überlapp der DNS-Färbung in den Immunfluoreszenzlichtkanal rechnerisch eliminiert wurde. Eine logarithmische Einheit auf der Volumenachse entspricht $13 \mu\text{m}^3$.

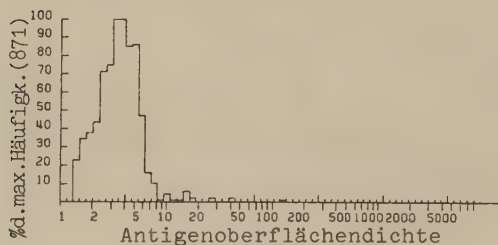
A. Volumenverteilung



B. Antigendichte lebende Zellen



C. Antigendichte tote Zellen



D. DNS-Profil tote Zellen

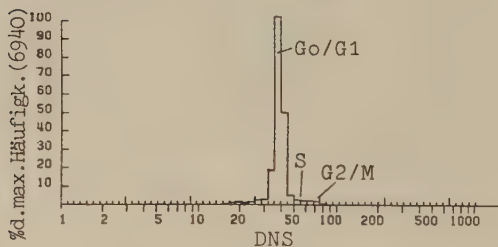


Abb. 31: Einparameterhistogramme der Auswertung von Abb. 30. Sie wurden durch Projektion der Daten der 2-Parameterkurve auf die jeweilige Koordinatenachse erhalten.

3.6.1 Antigenexpression residenter und paraffinölinduzierter Makrophagen

Bei der Auswertung der Durchflußzytometerhistogramme wurden vier Kompartimente (A, B, C, D) unterschieden (Abb. 30b). Das Kompartiment A enthält Entzündungszellen wie Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, B die antigenpositiven Entzündungszellen, C die antigennegativen und D die antigenpositiven Makrophagen. Im folgenden wurden die Kompartimente A und B bzw. C und D, d.h. Entzündungszellen und Makrophagen jeweils zusammen betrachtet.

Residente Makrophagen: Aufgrund der Eigenfluoreszenz waren 10 % der lebenden Makrophagen von Kompartiment C in Kompartiment D. Nach Inkubation der Zellen mit sekundärem Antikörper waren etwa 60 % der lebenden residenten Makrophagen nach alleiniger Inkubation (Kontrolle Nr. 20, Abb. 32a) angefärbt (Kompartiment D (Abb. 30b)).

Diese Bindung beruhte auf den bei der großen Mehrheit der Makrophagen vorkommenden Fc-Rezeptoren (McKeever & Spicer, 1980). Die Anfärbung ist nicht durch unspezifische Adsorption des 2. Antikörpers zu erklären, weil mit der hohen Konzentration von Nicht-Antikörperprotein (15 mg/ml BSA) im Meßansatz die unspezifische Adsorption an die Zelloberfläche weitgehend verhindert wurde. Daß dies in der Praxis auch gelang, ist aus der geringen Menge von Antikörpern, die unspezifisch an die Entzündungszellen band, ersichtlich. Nur 8 % dieser Zellen (Kompartiment A) waren antikörperpositiv. Die Auswertung der Prozentsätze makrophagenantigenpositiver Zellen ergab, daß die Entzündungszellen mit Ausnahme der Antikörper 4 und 8 nicht angefärbt wurden. Außerdem zeigte sich, daß die Antikörper Nr. 3 bis 15 zu den 70 % der Makro-

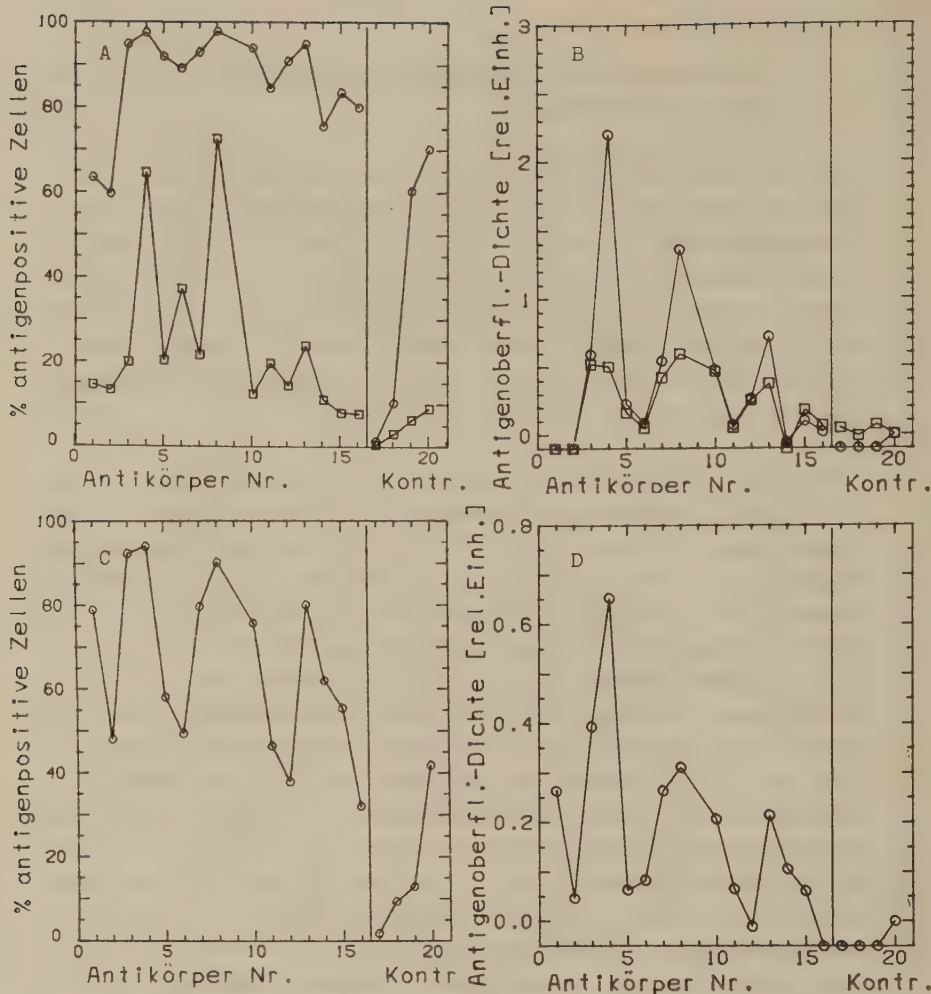


Abb. 32: Bindung monoklonaler Makrophagenantikörper an residente (A,B) und blindinduzierte (C,D) (14 Tage) Peritonealzellen.

Makrophagen (O) (III und IV, Kompartiment C der Abb. 30c), Lymphozyten-, Granulozyten-, Monozytenfraktion (□) (Kompartiment A der Abb. 30c)

Kontrollmessungen: Eigenfluoreszenz der ungefärbten Zellen (17), Eigenfluoreszenz lebender Zellen (tote Zellen mit Mithramycin gefärbt, nicht berücksichtigt) (18), lebende und tote Zellen mit sekundärem Antikörper (19), lebende Zellen mit sekundärem Antikörper (tote Zellen mit Mithramycin gefärbt, nicht berücksichtigt) (20). Die Meßwerte der Abb. B,D wurden auf die Kontrolle Nr. 20 standardisiert. Sie wurden dadurch gewonnen, daß von den Zellmembranpackungsdichten der fluoreszierenden Antikörper die Fc-Rezeptordichten und die Eigenfluoreszenz lebender Zellen entsprechend der Kontrolle Nr. 20 der Abb. A,C abgezogen wurde, um das spezifische Antigenmuster der Makrophagen in Abb. C,D zu erhalten.

phagen, die Fc-Rezeptoren trugen bzw. Eigenfluoreszenz zeigten, noch zwischen 15 % bis 28 % weitere Zellen anfärbten, so daß insgesamt bis zu 98 % aller Zellen gefärbt waren. Wegen dieser Überlagerung von Eigenfluoreszenz, Fc-Rezeptoren- und spezifischer Antikörperbindung ist eine genaue Abschätzung der spezifischen Antikörperbindung aus dem Anteil der fluoreszenzpositiven Zellen (Kompartiment C) der Abb. 32a nicht möglich. Wichtig hierfür ist die Darstellung der Fluoreszenzpackungsdichte der Zellen. Aus Gründen der

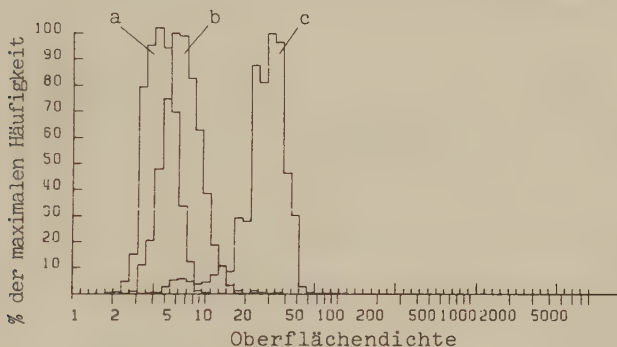


Abb. 33: Vergleich der Eigenfluoreszenz (als Packungsdichte auf die Zelloberfläche bezogen (Kontrolle Nr. 18)) (A) mit der Fc-Rezeptordichte (Kontrolle Nr. 20) (B) und der Makrophagenantigendichte (Antikörper Nr. 4) (C) residenter Makrophagen. Die Verteilungen wurden jeweils auf die maximale Häufigkeit (100 %) standardisiert.

Vergleichbarkeit wurde neben dem Fc-Rezeptor und den Makrophagenantikörpern auch die Eigenfluoreszenz als Packungsdichte auf die Oberfläche der Zelle bezogen. Es ergaben sich Werte von 0,6 rel. Einheiten für die Eigenfluoreszenz, von 0,15 rel. Einheiten für die Fc-Rezeptordichte und von 0,1 bis 2,2 rel. Einheiten für die Packungsdichte der Makrophagenantikörper (Abb. 33). Zur besseren Übersicht wurden

fluoreszenz und Fc Rezeptorendichte gemäß der Kontrolle Nr. 20 von allen anderen Ansätzen abgezogen und in Abb. 32b dargestellt.

Bei der Auswertung wurden die Makrophagenpopulationen III, IV und V (Abb. 20) zusammengefaßt, weil sie bei diesen Messungen nicht deutlich voneinander abgrenzbar sind (Abb. 30b). Um dennoch eine Aussage über die Antigenoberflächendichte auf kleinen und großen antigenpositiven Makrophagen treffen zu können, wurde das Makrophagenkompartiment III und IV durch eine Längslinie in der Klasse 38

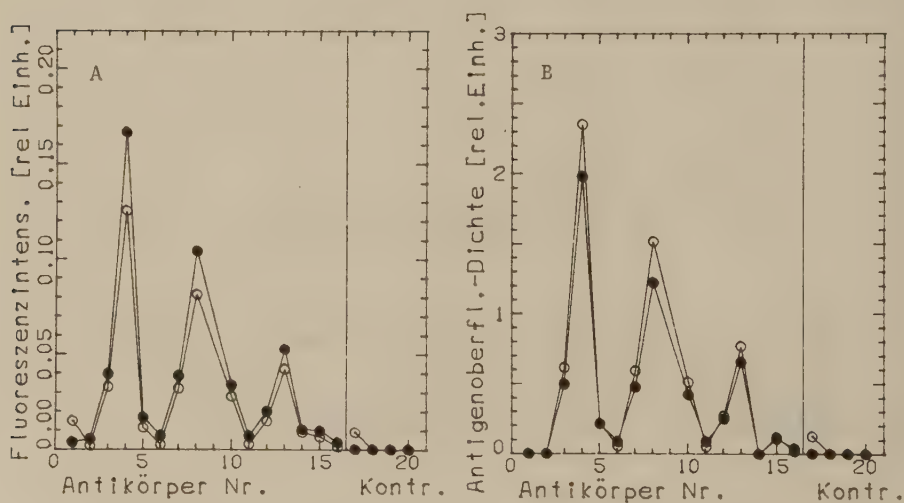


Abb. 34: Vergleich der Fluoreszenzintensität (A) mit der Oberflächendichte antigenexprimierender residenter Peritonealmakrophagen (B). Kleine Makrophagen (III) (O), Große Makrophagen (IV) (●). Kontrollmessungen wie in Abb. 32

der linearen Volumenskala (vgl. Abb. 20a) in Populationen

mit einem mittlerem Volumen von $545 \mu\text{m}^3$ und $992 \mu\text{m}^3$ aufgeteilt, die den Populationen III und IV entsprechen. Obwohl die mittlere Fluoreszenzintensität der großen Makrophagen (IV) um das 1,3fache höher war als die der kleinen Makrophagen (III) (Abb. 34a), betrug die mittlere Oberflächendichte der Antigene nur 80 % derjenigen der Pop. III-Makrophagen (Abb. 34b), weil sie gleichzeitig um das 1,8fache größer waren. Die beiden antigenpositiven Makrophagenpopulationen verhielten sich bezüglich des Grades der Antigenexpression ähnlich, d.h. sie zeigen ein ähnliches Antigenmuster.

Auffallenderweise reagierten 60 - 70 % der Zellen aus der Entzündungszellenfraktion (Kompartiment B (Abb. 30b)) mit Antikörper Nr. 4 und 8, 35 % mit Antikörper Nr. 6, aber nur 5 - 20 % mit den restlichen Antikörpern. Der hohe Anteil positiver Zellen für Antikörper Nr. 4 und 8 ist erstaunlich, da diese Antikörper mit isolierten Granulozyten nicht kreuzreagierten (Tab. 1). Zur Klärung, welche Zellen die Makrophagenantigene exprimieren, wurde die durchflußzytometrische Auswertung mit dem gefärbten Zytozentrifugenpräparat derselben Zellpräparation verglichen. Aufgrund der durchflußzytometrischen Messungen bestanden die Peritonealzellen aus 68 % Makrophagen (Kompartimente C und D der Abb. 30b) und insgesamt 32 % Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten (Kompartiment A und B). Die morphologische Untersuchung ergab 62 % Makrophagen, was gut mit dem durchflußzytometrisch ermittelten Anteil für Kompartiment C und D entspricht. Die restlichen 38 % der Zellen waren eosinophile Granulozyten (22 %) und Monozyten (16 %). Diese Zellen erscheinen bei der durchflußzytometrischen Messung in den Kompartimenten A und B. Das bedeutet, daß 40 % der Zellen der Kompartimente A und B aus Monozyten bestehen, die Vorstufen der Makrophagen sind. Unter der Annahme, daß alle Monozyten die Makrophagenantikörper Nr. 4 und 8 banden, war der Anteil der durchflußzytometrisch bestimmten antigenpositiven Zellen höher als die Zahl der Monozyten. Dies

könnte damit erklärt werden, daß auch einige Granulozyten antigenpositiv waren oder wahrscheinlicher damit, daß die vollständige Abgrenzung dieser Zellpopulationen zu den kleinen Makrophagen (III) des Kompartiments C wegen Volumenüberlapps nicht möglich ist. Der Nachweis einer Positivität des Antikörpers Nr. 8 für Monozyten im Radioimmunoassay (Mitteilung von Prof. Burger, Mainz) unterstützt die eigenen Befunde.

Ölinduzierte Makrophagen:

Im Vergleich zu den residenten Makrophagen, wo 60 % der Zellen den sekundären Antikörper banden, war dies für Ölinduzierte Makrophagen nur für 32 % der Zellen der Fall, d.h. die Ölinduzierten Zellen weisen einen geringeren Anteil Fc-Rezeptor positiver Zellen auf. Die Zahl eigenfluoreszierender Zellen war mit 10 % ähnlich. Bezüglich der Antikörper Nr. 1 bis 16 waren bis zu 80 % aller Makrophagen positiv. Die besser vergleichbare Oberflächendichte der Makrophagenantigene (Abb. 32d) folgte im Muster den residenten Zellen (Abb. 32b). Für die einzelnen Antigendichten ergaben sich jedoch quantitative Unterschiede.

Die mittlere Antikörperfluoreszenzintensität der Makrophagenpopulation IV war um das 1,9fache höher als Population III. Diese beiden Populationen wurden durch eine Längslinie in der Klasse 48 der linearen Volumenskala (Abb. 30b) aufgeteilt. In der mittleren Antigenoberflächendichte unterschieden sich die Makrophagenpopulationen dagegen nicht, weil die Population IV um das 2,6fache größer als Population III war.

Eine Untersuchung der toten (Mithramycin gefärbten) Makrophagen (3 %) ergab, daß etwa 90 % in der G0/G1-Phase des Zellzyklus waren. In der S bzw. G2/M-Phase waren 4 % (Abb. 30c, 31d). Dieser Befund steht im Einklang mit der allgemein vertretenen Ansicht, daß fast alle in der Bauchhöhle vorhandenen Makrophagen nicht mehr teilungsfähig sind (van Furth, 1980). Die Antigendichte auf den toten Zellen

konnte nach Korrektur der Fluoreszenzüberlagerung von FITC in den roten Fluoreszenzkanal (F2) und von Mithramycin in den gelben Bereich (F1) berechnet werden. Die Antigendichte betrug nur etwa 20 % derjenigen der lebenden Zellen (Abb. 30d, 31c).

Kreuzreaktion mit anderen Zellen:

Die Untersuchung frisch gewonnener Knochenmarks- und Milzzellen vom Meerschweinchen mit den 15 verschiedenen monoklonalen Antikörpern ergab, daß keiner der Antikörper signifikant mit diesen Zellen reagierte, d.h. die Antikörper zeigten keine nennenswerte Kreuzreaktion mit anderen Zellen des hämatopoetischen Systems.

3.6.2 Antigenexpression paraffinölinduzierter Peritonealmakrophagen nach in vitro Aktivierung

Ölinduzierte Peritonealzellen wurden zur in vitro Aktivierung mit poly I:C bzw. LPS inkubiert. In Abb. 35a sind die Muster der antigenpositiven Zellen frisch gewonnener Zellen und der Zellen nach 24-stündiger mit 100 µg/ml LPS, poly I:C und ohne Zusatz (siehe Kap. 2.11) dargestellt. Während der Inkubation ging die Zahl Fc-Rezeptorpositiver Zellen (Kontrolle Nr. 20) bei LPS-behandelten aber auch bei den unbehandelten Zellen zurück. Im Vergleich zu den frisch-gewonnenen Zellen war die Zahl der positiven Zellen der Antikörper Nr. 5 - 7, 10, 13 - 15 um durchschnittlich 35 % niedriger. Bei den poly I:C-behandelten Makrophagen war die Zahl der antigenpositiven Zellen ausser den Antikörpern Nr. 4, 8, 10, 11 um durchschnittlich 70 % vermindert.

Die Bestimmung der Oberflächenantigendichte ergab, daß die mittlere Antigendichte auf unbehandelten und LPS-behandelten Zellen nach eintägiger Inkubation einheitlich um etwa 40 % abnahm und keine qualitativen Unterschiede gegenüber frisch

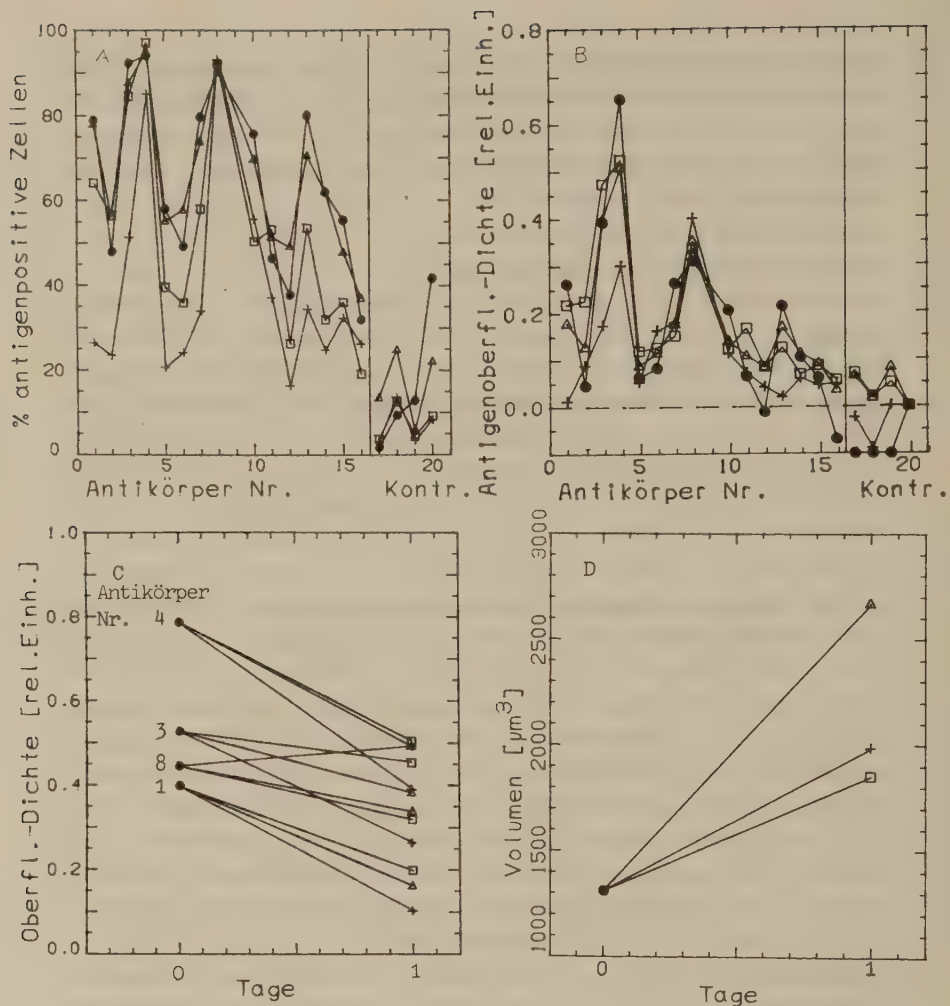


Abb. 35: Einfluß einer 24-stündigen Inkubation mit bzw. ohne 100 $\mu\text{g/ml}$ LPS und poly I:C auf den Anteil antigenpositiver Zellen (A), die Antigenoberflächendichte (B,C), und das Zellvolumen (D) paraffinölinduzierter Makrophagen. (Frisch gewonnene Makrophagen (●), unbehandelte Zellen (□), mit LPS (Δ) bzw. mit poly I:C (+) inkubierte Zellen am Tag 1.)

gewonnenen Zellen aufwies (Abb. 35b). Poly I:C zeigte dagegen eine deutliche Änderung des Antigenprofils. So war im Vergleich zu den frischgewonnenen Zellen die Packungsdichte der Antikörper Nr. 1, 3 und 4 um 50 % erniedrigt und die der restlichen Antikörper kaum verändert. Die Veränderungen der Packungsdichten einiger Antikörper in Abhängigkeit von der Inkubation sind in Abb. 35c zusammengefaßt.

Eine Zu- bzw. Abnahme der Antigenoberflächendichte muß nicht unbedingt auf eine Änderung der Antigenzahl beruhen. Aus Abb. 35d geht hervor, daß bei der Inkubation ohne Zusatz bzw. mit poly I:C das mittlere Zellvolumen (Abb. 35d) um 40 % und mit LPS um 100 % zunahm. Betrachtet man die mittlere Gesamtmenge der Antigene pro Zelle, so ergibt sich daß bei den unbehandelten Zellen die Antigenzahl unverändert blieb, durch LPS eine Neusynthese um etwa 60 % induziert wurde und durch poly I:C die von den Antikörpern Nr. 1, 3, und 4 erkannten Antigene auf die Hälfte reduziert wurden.

3.6.3 Vergleich residenter und induzierter Makrophagen

In der Bauchhöhle von Meerschweinchen wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie aufgrund funktioneller Zelleigenschaften 3 Makrophagenpopulationen (III, IV, V) unterschieden, von denen Population III und IV nach ihrem mittlerem Zellvolumen und die Population V aufgrund ihrer niedrigen Esteraseaktivität charakterisiert wurden. Population III und IV überlappten in ihrem Volumen und konnten bei residenten Zellen schwierig, bei ölunduzierten Zellen im allgemeinen gut unterschieden werden. Die Anteile dieser Populationen in ölunduzierten Peritonealzellen schwankten jedoch von Tier zu Tier erheblich. Auch bei anderen Tierarten wurden Heterogenitäten im Zellvolumen von Makrophagen beschrieben, wobei die Zellen meist nach ihrer Dichte aufgetrennt wurden. So

wurden von Morahan et al., (1982) residente, Thioglycollat- und Corynebacterium parvum- induzierte bzw. aktivierte Mauseperitonealmakrophagen durch eine Ficollstufenzentrifugation in zwei Fraktionen mit einem Zellvolumen von $150 - 275 \mu\text{m}^3$ bzw. $300 - 600 \mu\text{m}^3$ aufgeteilt. Diese Populationen unterschieden sich funktionell u.a. darin, daß nur die großen Zellen (bei den Corynebacterium parvum-aktivierten Makrophagen) Tumor-zytotoxisch waren.

Die Messung der Esteraseaktivität mit ADB als Substrat ergab, daß Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten deutlich positiv waren. Die Lymphozyten und Granulozyten wiesen eine bis 1,4fach höhere intrazelluläre DCH-Konzentration als Makrophagen auf. Dies scheint zunächst dem schon lange bekannten Befund zu widersprechen, wonach bei Makrophagen, nicht aber bei Granulozyten und Lymphozyten eine hohe "unspezifische" Esteraseaktivität mit α -Naphtyl-acetat, Naphtol AS-acetat oder Naphtol AS-D-acetat nachgewiesen wurde. Mit Naphtol AS-D-chloroacetat dagegen reagieren neutrophile Granulozyten, nicht aber mononukleäre Phagozyten und Lymphozyten (Schmalzl & Braunsteiner, 1968). Neben dieser Differenzierung zwischen verschiedenen Zellarten kann außerdem noch innerhalb der Makrophagen ihre "unspezifische" Esteraseaktivität in Abhängigkeit von dem verwendeten Substrat weiter unterschieden werden. So zeigten während der Abheilung BCG-induzierter Hautverletzungen (Tsuda et al., 1979) einige "unspezifische" Esterasesubstrate unterschiedliche Aktivitätsprofile in den Makrophagen. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß die verschiedenen Esterasefarbstoffe jeweils verschiedene Esterasegruppen erfassen, die sich in ihrem Aktivitätsmuster offenbar erheblich unterscheiden.

Die Makrophagenpopulation V lag in ihrem Volumen zwischen Population II und IV und war durch eine niedrige Esterasekonzentration (8 % der Konzentration esterases positiver Makrophagen). Ihr Anteil betrug bei frisch gewonnenen Zellen weniger als 5 %, nahm aber während einer in vitro Inkubation

zu. Da sie zu etwa der Hälfte aus toten Zellen zusammengefaßt war, könnte es sich bei ihnen um absterbende Makrophagen handeln. Kürzlich wurde von einer Population esterasenegativer mononukleärer Phagozyten bei rheumatischer Arthritis berichtet (Hurst et al., 1983).

Die Untersuchung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen mit dem Fluvo-Metricell-Durchflußzytometer erlaubte eine gute Unterscheidung sowohl der Phagozytosefähigkeit einzelner Peritonealzellarten, als auch die simultane Differenzierung phagozytierender, esterasepositiver und -negativer Zellen. Die Meßtechnik erfordert keine zeitaufwendigen Verfahren zur Abtrennung nicht phagozytierter Partikel von den Zellen (Kavet et al., 1980), da die freien Partikel in ihrer Größe (1,25 μm) bei der elektrischen Volumenbestimmung vollständig von den Zellen unterscheidbar sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die opsonin-abhängige Phagozytose carboxylierter Latexpartikel durch residente Peritonealzellen untersucht. Durch die zusätzliche Anfärbung mit ADB wurde nach entsprechender Änderung der Lichtfilter sequentiell die Phagozytosefähigkeit und das pH_i gemessen. Mehr als 90 % aller Makrophagen, jedoch nur ein geringer Anteil (5 %) der Zellen aus der Granulozytenfraktion phagozytierten Partikel. Die Granulozyten, die in der residenten Bauchhöhle von Meerschweinchen der eosinophilen Gruppe angehören, sind durch eine geringe Phagozytosefähigkeit charakterisiert und können Partikel einer Größe über 0,8 μm nicht phagozytieren (Beeson & Bass, 1977). Bei den wenigen, jedoch stark phagozytierenden Zellen aus dem Granulozytenbereich dürfte es sich um Zellen monozytären Ursprungs handeln, die ein ähnliches Volumen wie Granulozyten besitzen. Die Bestimmung des pH_i ergab, daß im Vergleich zu einer Kontrollinkubation ohne Partikel die phagozytierenden Makrophagen, nicht aber die Granulozyten zunächst um 0,2 pH-Einheiten alkalischer, dann aber nach 3 Stunden um denselben Betrag saurer wurden. Die leichte Alkalinisierung läßt auf eine allgemeine Aktivierung des Stoffwechsels, die

nachfolgende Ansäuerung auf eine Zunahme des lysosomalen Zellkompartiments schließen (Munthe-Kaas & Kaplan, 1980).

Neben der Phagozytose wird die Adhärenzfähigkeit als ein charakteristisches Merkmal für Makrophagen bezeichnet. Die eigenen Versuche bestätigten die Trypsinresistenz adhärenter Makrophagen, zeigte aber gleichzeitig, daß die Adhärenzfähigkeit ölunduzierter Makrophagen unter erschwerten Bedingungen (nicht hydrophilisierte Plastikpetrischalen, kein Serumzusatz im Kulturmedium) uneinheitlich ist. Es waren nur 50 - 60 % unabhängig von der Inkubationsdauer adhärent. Die adhärenenten und nicht adhärenenten Makrophagen unterschieden sich in keiner der untersuchten funktionellen Eigenschaften voneinander.

Zur Charakterisierung von Syntheseparametern, d.h. von zellulären Eigenschaften, die auf Syntheseleistungen beruhen, wurde die Expression makrophagenspezifischer Antigene auf der Zellmembran untersucht. Die Bestimmung dieser Antigene mit monoklonalen anti-Meerschweinchenmakrophagenantikörpern über die indirekte Immunfluoreszenz zeigte die Notwendigkeit zur Unterscheidung der relativen Antigenpositivität und der Antigenpackungsdichte antigenpositiver Zellen. Das Muster der Expression ölunduzierter Makrophagen war gegenüber residenten Zellen nicht signifikant verändert. Eine in vitro Inkubation der Zellen mit makrophagenaktivierenden Substanzen induzierte bei einem Zusatz von poly I:C, nicht aber von LPS gegenüber dem Kontrollansatz eine Veränderung der Packungsdichte einiger Antigene. Die Zunahme des mittleren Makrophagenzellvolumens in Gegenwart von LPS gegenüber den unbehandelten und poly I:C behandelten Zellen um fast das Doppelte ließ den Schluß zu, daß LPS eine Neusynthese aller Makrophagenantigene, poly I:C hingegen eine Abnahme einzelner Antigene bewirkte. Dies kann als ein weiterer Hinweis dafür gelten, daß der Grad der Aktivierung für LPS und poly I:C unterschiedlich ist (Taramelli & Varesio), bzw. daß die Aktivierung ein mehrstufiger Vorgang

ist (Johnson et al., 1983).

Etwa 60 % der residenten Makrophagen banden mit einer relativ niedrigen Packungsdichte den sekundären Kaninchen-anti-Maus-Antikörper. Die Bindung dieses IgG-Antikörpers erfolgte wahrscheinlich über die Fc-Rezeptoren der Makrophagen. Die Fc-Rezeptoren, die eine wichtige Rolle bei der ADCC, Phagozytose und Immunregulation der Makrophagen spielt, ist bei Meerschweinchen erst teilweise charakterisiert; so bindet er auch Kaninchen IgG (Janusz et al., 1983). Die Beziehung dieser gefundenen Abnahme der Fc-Rezeptoren mit der Stimulation und Aktivierung von Makrophagen wurde nicht weiter untersucht. In der Literatur wird zwar meistens die Ansicht vertreten, daß die Fc-Rezeptor-Aktivität mit einer Aktivierung ansteigt (z.B. Rhodes, 1975), neuere Untersuchungen kamen allerdings zu einem entgegengesetzten Befund (Ezekowitz & Gordon, 1982).

Innerhalb der Makrophagen, aber auch im Vergleich von Makrophagen zu Granulozyten und Lymphozyten wurde beobachtet, daß Aktivität der Zellen mit Zunahme des Volumens abnahm. So besaßen die kleineren Zellen die höchste Esterasekonzentration bzw. die höchste Phagozytoseaktivität. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Holian et al. (1983) bei der Untersuchung der Konzentration gewisser Proteine in unterschiedlich großen Alveolar-Meerschweinchenmakrophagen.

4.0 ZUSAMMENFASSUNG

1. In dieser Arbeit wurden Verfahren zur simultanen Messung verschiedener funktioneller und biochemischer Eigenschaften von Makrophagen auf Einzelzellebene mit dem 3-Parameter-Durchflußzytometer "Fluvo-Metricell" erarbeitet. Das Gerät ermöglicht eine schnelle Messung von Volumen und von zwei Fluoreszenzen an Einzelzellen.
2. Es wurde eine neue Methode zur Messung des intrazellulären pH mit Dicyan-hydrochinon als Fluoreszenzindikator entwickelt. Es ist durch eine pH-abhängige Verschiebung der Fluoreszenzfarbe charakterisiert, was eine von der Fluoreszenzintensität unabhängige pH-Messung ermöglicht. Die veresterte Form des Farbstoffs ist membranpermeabel. Von intrazellulären Esterasen wird DCH abgespalten, das sich in lebenden Zellen anreichert. Somit kann mit diesem Farbstoff die Vitalität der Zellen, die Esteraseaktivität und das intrazelluläre pH bestimmt werden. Durch Verwendung von Ionophoren und Vergiften des Zellstoffwechsels ist eine Eichung der pH-Messung möglich.
3. Aufgrund der Esteraseaktivität und des Zellvolumens wurden zwei esterasepositive Makrophagenpopulationen unterschieden, die bei Ölunduzierten Zellen ein mittleres Volumen von 420 bzw. 1200 μm^3 und ein intrazelluläres pH von 7,27 bzw. 7,13 besaßen. Eine weitere Makrophagenpopulation mit niedriger Esteraseaktivität umfaßte nur 5 - 10 % aller Zellen und wies einen sauren pH-Wert im Bereich 6.5 - 6.8 auf.
4. Am Beispiel des Insulins wurde untersucht, ob eine Hormonwirkung auf Zellen durch Änderung des intrazellulären pH erfaßt werden kann. Die Untersuchung der

Insulinwirkung auf Humanmonozyten während einer Inkubation mit Glucosezusatz ergab innerhalb von 5 Minuten eine Alkalinisierung der Zellen um etwa 0,2 pH-Einheiten. Somit können kurzzeitige Änderungen des pH_i eine frühe Antwort der Zelle auf Hormoneinwirkung sein.

5. Als eine wesentliche Makrophageneigenschaft wurde die Phagozytosefähigkeit durch Vorgabe von monodispersen Latexpartikeln geprüft. Fast alle residenten Makrophagen (über 90 %) phagozytierten carboxylierte Latexpartikel. Die Phagozytose war die ersten 3 Stunden mit einer intrazellulären Alkalinisierung und einer anschließenden Ansäuerung (um jeweils 0,2 pH-Einheiten gegenüber der Kontrolle) verbunden. Die spezifische Freßaktivität der kleinen Makrophagen war 4mal größer als die der großen Makrophagen.
6. Zur weiteren Aufgliederung der peritonealen Makrophagenpopulationen wurden deren Antigenmuster mit Hilfe monoklonaler Anti-Meerschweinchen-Makrophagen-Antikörper Membranantigene residenter und ölunduzierter Makrophagen untersucht. Die Bestimmung der Oberflächendichte der Antigene auf den Zellmembranen ergab, daß die Antikörper an allen antigenpositiven Zellen einheitlich banden.
7. In Abhängigkeit vom Aktivierungszustand zeigten ölunduzierter Makrophagen nach einer in vitro Aktivierung mit LPS und poly I:C in Abhängigkeit von der verwendeten Substanz Änderungen in der Dichte und im Muster makrophagenspezifischer Antigene.

5.0 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, D.O., Edelson, P.J., Koren, H.S. (Hrsg.): **Methods for studying mononuclear phagocytes**. Academic Press, New York, London (1981).
- Beck-Nielsen, H., Kragballe, K., Pedersen, O., Ellegård, J., Sørensen, N.S.: Insulin binding and insulin effect in pure preparations of human monocytes. In: Andreani, D., De Pirro, R., Lauro, R., Olefsky, J.M., Roth, J. (Hrsg.) **Current views on insulin receptors**. S. 367-375. Academic Press, London, New York 1982.
- Beck-Nielsen, H., Pedersen, O.: Insulin binding, insulin degradation and glucose metabolism in human monocytes. **Diabetologica** 17, 77-84 (1979).
- Beeson, P.B., Bass, D.A.: The eosinophil. In: Smith Jr., L.H. (Hrsg.) **Major problems in internal medicine** Vol. 14. S. 46-49. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto 1977.
- Benker, G., Kachel, V., Valet, G.: A computer controlled data managing system for multiparameter flow cytometric analyses. In: Laerum, O., Lindmo, T., Thoroud, E. (Hrsg.) **Flow cytometry IV** S. 116-119. Universitetsforlaget Bergen, Bergen, Norway 1980.
- Bieger, W., Weicker, H., Michl, J.: Transport and utilization of amino acids and glucose in human monocytes: Activation of glucose metabolism by insulin. **J. Clin. Endocrin. Metabol.** 50, 1121-1126 (1980).
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254 (1976).
- Brown, R.G., Porter, G.: Effect of pH on the emission and absorption characteristics of 2,3-dicyano-p-hydroquinone. **J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1** 73, 1281-1285 (1977).
- Catsimpoolas, N.: **Methods of cell separation**, Volume 1-3. Plenum Press, New York, 1977.
- Coulter, W.H.: Means for counting particles suspended in a fluid. U.S. Patent No. 2.656.508 (1953).
- Cowing, C., Schwartz, B.D., Dickler, H.B.: Macrophage Ia antigens. I. Populations differ in their expression of Ia antigens. **J. Immunol.** 120, 378-384 (1978).

- Crissman, H.A., Tobey, R.A.: Cell cycle analysis in 20 minutes. *Science* 184, 1297-1298 (1974).
- Czech, M.P.: Molecular basis of insulin action. *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 359-384, (1977).
- Daems, W.T.: Peritoneal macrophages. In: Carr, I., Daems, W.T. (Hrsg.) *The reticuloendothelial system. A comprehensive treatise* Volume 1, Morphology. S. 57-127. Plenum Press, New York and London, 1980.
- Daems, W.T., van der Rhee, H.J.: Peroxidase and catalase in monocytes, macrophages, epitheloid cells and giant cells of the rat. In: van Furth, R. (Hrsg.) *Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects*. S. 43-60. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London 1980.
- Deutsch, C., Taylor, J.S., Wilson, D.F.: Regulation of intracellular pH by human peripheral blood lymphocytes as measured by ^{19}F NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7944-7948 (1982).
- Dunning, W.F.: Steroid-responsive neoplasms in rats and mice. In: Pincus, G., Vollmer, E.P. (Hrsg.) *Biological activities of steroids in relation to cancer*. S. 225-256. Academic Press, New York and London 1960.
- Evans, R., Alexander, P.: Mechanisms of extracellular killing of nucleated mammalian cells by macrophages. In: Nelson, D.S. (Hrsg.) *Immunobiology of the macrophage*. S. 535-576. Academic Press, New York, San Francisco, London (1976).
- Ezekowitz, R.A.B., Austyn, J., Stahl, P.D., Gordon, S.: Surface properties of Bacillus Calmette-Guerin-activated mouse macrophages. Reduced expression of Mannose-specific endocytosis, Fc receptors, and antigen F4/80 accompanies induction of Ia. *J. Exp. Med.* 154, 60-76 (1981).
- Fazekas de St.Groth, S., Scheidegger, D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 35, 1-21 (1980).
- van Furth, R.: Cells of the mononuclear phagocyte system. Nomenclature in terms of sites and conditions. In: van Furth, R. (Hrsg.) *Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects*. S. 1-40. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London 1980.
- van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L.: The mononuclear phagocyte system. A new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 46, 845-852 (1972).

- van Furth, R., Diesselhoff-den Dulk, M.M.C., Raeburn, J.A., van Zwet, T.L., Crofton, R., Blussé van Oud Alblas, A.: Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. In: van Furth, R. (Hrsg.) **Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects.** S. 279-298. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London 1980.
- Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H., Waring, M.J.: **The molecular basis of antibiotic action.** John Wiley and Sons, London, New York, Sydney, Toronto, 1981.
- Gerson, D.F.: Determination of intracellular pH changes in lymphocytes with 4-methylumbelliferone by flow microfluorometry. In: Nuccitelli, R., Deamer, D.W. (Hrsg.) **Intracellular pH: Its measurement, regulation, and utilization in cellular functions.** S. 125-133. Alan R. Liss, Inc. New York 1982.
- Gerson, D.F., Kiefer, H., Eufe, W.: Intracellular pH of mitogen-stimulated lymphocytes. **Science** 216, 1009-1010 (1982).
- Giesen, C., Meyer, H.E., Junger, E.: Insulinbindung an mononukleären Leukozyten (Autoradiographische Bestimmung der relativen Bindungsanteile von Monozyten und Lymphozyten. **Act. Endocrin.** 4, 80 (1983) Abstr.
- Gillies, R.J.: Intracellular pH and proliferation in yeast, Tetrahymena and sea urchin eggs. In: Nuccitelli, R., Deamer, D.W. (Hrsg.) **Intracellular pH: Its measurement, regulation, and utilization in cellular function.** S. 341-359. Alan R. Liss, Inc. New York 1982.
- Gillies, R.J., Alger, J.R., den Hollander, J.A., Shulman, R.G.: Intracellular pH measured by NMR: Methods and results. In: Nuccitelli, R., Deamer, D.W. (Hrsg.) **Intracellular pH: Its measurement, regulation, and utilization in cellular functions.** S. 79-104. Alan R. Liss, Inc. New York 1982a.
- Gillies, R.J., Deamer, D.W.: Intracellular pH changes during the cell cycle in Tetrahymena. **J. Cell. Physiol.** 100, 23-32 (1979).
- Gillies, R.J., Ogino, T., Shulman, R.G., Ward, D.C.: ³¹P nuclear magnetic resonance evidence for the regulation of intracellular pH by Ehrlich Ascites tumor cells. **J. Cell Biol.** 95, 24-28 (1982b).
- Goldberg, M.: Anreicherung und Charakterisierung eines Leberzell-proliferationsfaktors aus teilhepatektomierten Ratten. Dissertation Univ. München, 1980.

- Gurr: Biological staining methods. Hopkin and Williams, Essex, GB 1980.
- Harthus, H.-P., Hannig, K.: Partial characterization of lymphokines that change the surface charge density of human polymorphonuclear leukocytes. *Immunobiol.* 162, 141-152 (1982).
- Henze, H., Chait, A.: Lysosomal enzyme activities and low density lipoprotein receptors in circulating mononuclear cells. Effect of insulin therapy in diabetic patients. *Diabetologica* 20, 625-629 (1981).
- Hilf, R., Michel, I., Bell, C., Freeman, J.J., Borman, A.: Biochemical and morphologic properties of a new lactating mammary tumor line in the rat. *Cancer Res.* 25, 286-299 (1965).
- Holian, A., Dauber, J.H., Diamond, M.S., Daniele, R.P.: Separation of bronchoalveolar cells from the guinea pig on continuous gradients of Percoll: Functional properties of fractionated lung macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.* 33, 157-164 (1983).
- Hopper K.E., Wood, P.R., Nelson, D.S.: Macrophage heterogeneity. *Vox sang.* 36, 257-274 (1979).
- Hurst, N.P., Nuki, G., Wallington, T.: Functional defects of monocyte C3b-receptor-mediated phagocytosis in rheumatoid-arthritis (RA) - Evidence for an association with the appearance of a circulating population of non-specific esterase-negative mononuclear phagocytes. *Ann. Rheumat. Dis.* 42, 487-493 (1983).
- Janusz, M., Starościk, K., Gorczyca, W., Wieczorek, Z., Lisowski, J.: Guinea-pig peritoneal macrophage receptor for IgG. II. Purification of the receptor and its partial characterization. *Molec. Immunol.* 20, 1149-1155 (1983).
- Johnson, J.D., Epel, D., Paul, M.: Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilisation. *Nature* 262, 661-664 (1976).
- Johnson, W.J., Marino, P.A., Schreiber, R.D., Adams, D.O.: Sequential activation of murin mononuclear phagocytes for tumor cytolysis: Differential expression of markers by macrophages in the several stages of development. *J. Immunol.* 131, 1038-1043 (1983).
- Kachel, V.: Sizing of cells by the electrical resistance pulse technique. Methodology and application in cytometric systems. In: Catsimpoilas N. (Hrsg.) *Cell analysis*, Volume 1. S.195-331. Plenum Press, New York and London, 1982.

- Kachel, V., Glossner, E., Kordwig, E., Ruhenstroth-Bauer, G.: Fluvo-Metricell, a combined cell volume and cell fluorescence analyser. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 804-812 (1977).
- Kahn, C.R., Roth, J.: Insulin receptors in disease states. In: Levey, G.S. (Hrsg.) **Hormone - receptor interaction: Molecular aspects**. Modern pharmacology - toxicology, Volume 9. S. 1-29. Marcel Dekker, New York, 1976.
- Kavet, R.I., Brain, J.D.: Methods to quantify endocytosis: a review. *J. Reticuloendothel. Soc.* 27, 201-221 (1980).
- Key, M.E., Hoyer, L., Bucana, C., Hanna Jr., M.G.: Mechanisms of macrophage-mediated tumor cytolysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 146, 265-310 (1982).
- Klimetzek, V., Remold, H.G.: The murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell. Immunol.* 53, 257-266 (1980).
- Krishan, A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* 66, 188-193 (1975).
- Kruth, H.S.: Flow cytometry: Rapid biochemical analysis of single cells. *Analyt. Biochem.* 125, 225-242 (1982).
- Leblanc, P.A., Russel, S.W., Chang, S.M.T.: Mouse mononuclear phagocyte antigenic heterogeneity detected by monoclonal-antibodies. *J. Reticuloendothel. Soc.* 32, 219-231 (1982).
- Li, C.Y., Lam, D.W., Yam, L.T.: Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 21, 1-12 (1973).
- Lohmann-Matthes, M.-L., Domzig, W.: Natural cytotoxicity of macrophage precursor cells and of mature macrophages. In: Herberman, R.B. (Hrsg.) **Natural cell-mediated immunity against tumors**. S.117-129. Academic Press, New York, 1980.
- McKeever, P.E., Spicer, S.S.: Surface receptors of mononuclear phagocytes. In: Carr, I., Daems, W.T. (Hrsg.) **The reticuloendothelial system. A comprehensive treatise** Volume 1, Morphology. S. 161-258. Plenum Press, New York and London, 1980.
- Malin-Berdel, J., Valet, G.: Flow cytometric determination of esterase and phosphatase activities and kinetics in hematopoietic cells with fluorogenic substrates. *Cytometry* 1, 222-228 (1980).

- Mauer, U.: Dissertation Univ. Mainz 1983.
- Melamed, M.R., Mullaney P.F., Mendelsohn M.L.: **Flow cytometry and sorting**. Wiley, New York (1979).
- Metchnikoff, E.: **Immunity in infective diseases**. Cambridge Univ. Press,
- Moore, R.D., Fidelman, M.L., Hansen, J.C., Otis, J.N.: The role of intracellular pH in insulin action. In: Nuccitelli, R., Deamer, D.W. (Hrsg.) **Intracellular pH: Its measurement, regulation, and utilization in cellular functions**. S. 385-416. Alan R. Liss, Inc. New York 1982. London and New York (1905).
- Moore, R.D., Fidelman, M.L., Seeholzer, S.H.: Correlation between insulin action upon glycolysis and change in intracellular pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 905-910 (1979).
- Morahan, P.S.: Macrophage nomenclature: Where are we going? (Editorial). *J. Reticuloendothel. Soc.* 27, 223-245 (1980).
- Morahan, P.S., Rozner, M.A., Jessee, E.J.: Effect of elicitation on peritoneal macrophage sub-populations - size distributions, ectoenzyme phenotypes and anti-tumor activity. *Int. J. Cancer* 30, 787-794 (1982).
- Munthe-Kaas, A.C., Kaplan, G.: Endocytosis by macrophages. In: Carr, I., Daems, W.T. (Hrsg.) **The reticuloendothelial system. A comprehensive treatise** Volume 1, Morphology. S. 19-55. Plenum Press, New York and London, 1980.
- Navon, G., Ogawa, S., Shulman, R.G., Yamane, T.: ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of Ehrlich Ascites tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 87-91 (1977).
- Nuccitelli, R., Heiple, J.M.: Summary of the evidence and discussion concerning the involvement of pH in the control of cellular functions. In: Nuccitelli, R., Deamer, D.W. (Hrsg.) **Intracellular pH: Its measurement, regulation, and utilization in cellular functions**. S. 567-586. Alan R. Liss, Inc. New York 1982.
- Ohkuma, S., Poole, B.: Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3327-3331 (1978).
- Pollard, H.B., Shindo, H., Creutz, C.E., Pazoles, C.J., Cohen, J.S.: Internal pH and state of ATP in adrenergic chromaffin granules determined by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 254, 1170-1177 (1979).

- Reijngoud, D.J., Oud, P.S., Kâs, J., Tager, J.M.: Relationship between medium pH and that of the lysosomal matrix as studied by two independent methods. *Biochim. Biophys. Acta* 448, 290-302 (1976).
- Rhodes, J: Macrophage heterogeneity in receptor activity: The activation of macrophage Fc receptor function in vivo and in vitro. *J. Immunol.* 114, 976-981 (1975).
- Rocklin, R.E., Bendtzen, K., Greineder, D.: Mediators of Immunity: Lymphokines and Monokines. *Adv. Immunol.* 29, 55-136 (1980).
- Rogers, J., Hesketh, T.R., Smith, G.A., Metcalfe, J.C.: Intracellular pH of stimulated thymocytes measured with a new fluorescent indicator. *J. Biol. Chem.* 258, 5994-5997 (1983).
- Roos, A., Boron, W.F.: Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61, 296-434 (1981).
- Roos, A., Keifer, D.W.: Estimation of intracellular pH from distribution of weak electrolytes. In: Nuccitelli, R., Deamer, D.W. (Hrsg.) *Intracellular pH: Its measurement, regulation, and utilization in cellular functions*. S. 55-59. Alan R. Liss, Inc. New York 1982.
- Rosenthal, A.S.: Regulation of the immune response - role of the macrophage. *New Engl. J. Med.* 303, 1153-1156 (1980).
- Rotman, B., Papermaster, B.W.: Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55, 134-141 (1966).
- Schermer, S.: *The blood morphology of laboratory animals*. Third edition, F.A. Davis Company, Philadelphia, 1967.
- Schmalz, F., Braunsteiner, H.: Cytochemische Darstellung von Esteraseaktivitäten in Blut- und Knochenmarkszellen. *Klin. Wschr.* 46, 642-650 (1968).
- Schroff, G., Neumann, C., Sorg, C.: Transglutaminase as a marker for subsets of murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 11, 637-642 (1981).
- Schwartz, R.H., Bianco, A.R., Handwerger, B.S., Kahn, C.R.: Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocytes: Implications for studies of insulin-resistant states in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 474-478 (1975).

- Seglen, P.O.: Hepatocyte suspensions and cultures as tools in experimental carcinogenesis. In: Lapis, K., Johannessen, J.V. (Hrsg.) **Liver carcinogenesis** S. 381-390. Hemisphere Publishing Corp., Washington, New York, London 1979.
- Simons, E.R., Schwartz, D.B., Norman, N.E.: Stimulus response coupling in human platelets: Thrombin-induced changes in pH. In: Nuccitelli, R., Deamer, D.W. (Hrsg.) **Intracellular¹ pH: Its measurement, regulation, and utilization in cellular functions.** S. 463-482. Alan R. Liss, Inc. New York 1982.
- Slonczewski, J.L., Rosen, B.P., Alger, J., R., Macnab, R.M.: pH homeostasis in *Escherichia coli*: Measurement by ³¹P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 78, 6271-6275 (1981).
- Steinman, R.M., Cohn, Z.A.: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. **J. Exp. Med.** 139, 380-397 (1974).
- Suga, M., Dannenberg Jr., M., Higuchi, S.: Macrophage functional heterogeneity in vivo: Macrolocal and microlocal macrophage activation, identified by double-staining tissue sections of BCG granulomas for pairs of enzymes. **Am. J. Pathol.** 99, 305-324 (1980).
- Taramelli, D., Varesio, L.: Activation of murine macrophages. I. Different pattern of activation by poly I:C than by lymphokines or LPS. **J. Immunol.** 127, 58-63 (1981).
- Thiele, J., Günther, F.: Ueber Abkömmlinge des Dicyanhydrochinons. **Ann. d. Chem.** 349, 45-66 (1906).
- Thiele, J., Meisenheimer, J.: Ueber die Addition von Blausäure an Chinon. **Ber. d. deutsch. chem. Ges.** 33, 675-676 (1900).
- Thomas, J.A., Buchsbaum, R.N., Zimniak, A., Racker, E.: Intracellular pH measurements in Ehrlich Ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. **Biochem.** 18, 2210-2218 (1979).
- Tsuda, T., Ando, M., Shima, K., Sugimoto, M., Onizuka, O., Tokumi, H.: Chronologic changes of activities of naphtol AS-D acetate esterase and other nonspecific esterases in the mononuclear phagocytes of tuberculous lesions. **Am. J. Pathol.** 97, 235-246 (1979).

- Ugelstad, J., Mørk, P.C.: Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation of emulsions and polymer dispersions. *Adv. in Colloid and Interface Science* 13, 101-140 (1980).
- Valet, G.: Graphical representation of three-parameter flow cytometer histograms by a newly developed FORTRAN IV computer program. In: Laerum, O., Lindmo, T., Thoroud, E. (Hrsg.) *Flow cytometry IV*. S. 125-129. Universitetsforlaget Bergen, Bergen, Norway 1980.
- Valet, G., Raffael, A., Moroder, L., Wünsch, E., Ruhenstroth-Bauer, G.: Fast intracellular pH determination in single cells by flow-cytometry. *Naturwiss.* 68, 265-266 (1981).
- Visser, J.W.M., Jongeling, A.A.M., Tanke, H.J.: Intracellular pH-determination by fluorescence measurements. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 32-35 (1979).
- Walker, W.S.: Macrophage functional heterogeneity. In: Normann S.J., Sorkin E. (Hrsg.) *Macrophages and natural killer cells. Regulation and function*. S. 435-443. Plenum Press, New York and London 1982.
- Walker, W.S., Hester, R.B., Beelen, R.H.J.: Persistent expression of Ia-antigen on a subpopulation of murine resident peritoneal macrophages. *Cell. Immunol.* 79, 125-133 (1983).
- Walker, W.S., Yen, S.-E.: Complement receptor phenotypes of culture-derived murine macrophages. *J. Cell. Phys.* 110, 277-284 (1982).
- de Water, R., van't Noordende, J.M., Ginsel, L.A., Daems, W.T.: Heterogeneity in wheat germ agglutinin binding by mouse peritoneal macrophages. *Histochem.* 72, 333-339 (1981).
- Weast, R.C. (Hrsg.): *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 59th edition. S. D-190. CRC Press, West Palm Beach, Florida 1978/79.
- Weinberg, J.B., Chapman, H.A. Jr., Hibbs, J.B. Jr.: Characterization of the effects of endotoxin on macrophage tumor cell killing. *J. Immunol.* 121, 72-80 (1983).

Mein Lebenslauf

- 29.8.1954 geboren in München, als Sohn der Eheleute Dr. iur. Horst Raffael und Judith, geb. Bejbl
- 1960-1965 Volksschule in Landshut und München
- 1965-1974 Humanistisches und Neusprachliches Gymnasium in München
- 1974 Reifeprüfung
- 1974-1979 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 1979 Diplomprüfung in der Fächerkombination Pflanzenphysiologie, Mikrobiologie und Biochemie
- 1979-1980 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Dr. W. Schiebel und Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer. Titel: "Anreicherung und Charakterisierung von zwei DNA-Polymerasen aus *Physarum polycephalum*"
- 1980 Beginn der Dissertation am Max-Planck-Institut für Biochemie.

